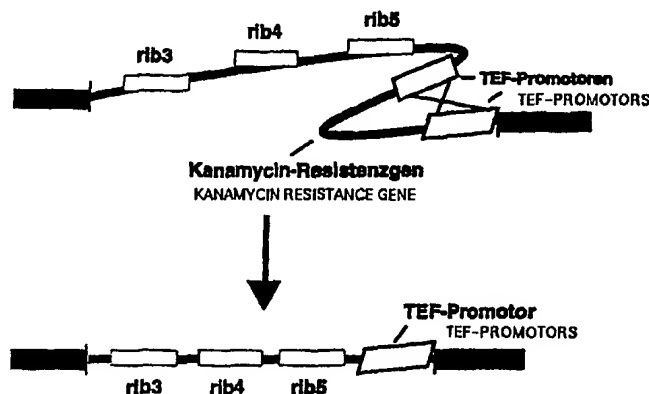


<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/52, 15/80, 1/15, C12P 25/00</b></p>	<b>A2</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/61623</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. Dezember 1999 (02.12.99)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03196</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Mai 1999 (10.05.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 23 834.7      28. Mai 1998 (28.05.98)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ALTHÖFER, Henning [DE/DE]; Mainstrasse 12, D-67117 Limburgerhof (DE). SEULBERGER, Harald [DE/DE]; Im Speyerer Wingert 25, D-67141 Neuhofen (DE). ZELDER, Oskar [DE/DE]; Rossmarktstrasse 27, D-67346 Speyer (DE). REVUELTA DOVAL, Jose Luis [ES/ES]; Grillo 11, 4 E, E-37001 Salamanca (ES).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03196</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Mai 1999 (10.05.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 23 834.7      28. Mai 1998 (28.05.98)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ALTHÖFER, Henning [DE/DE]; Mainstrasse 12, D-67117 Limburgerhof (DE). SEULBERGER, Harald [DE/DE]; Im Speyerer Wingert 25, D-67141 Neuhofen (DE). ZELDER, Oskar [DE/DE]; Rossmarktstrasse 27, D-67346 Speyer (DE). REVUELTA DOVAL, Jose Luis [ES/ES]; Grillo 11, 4 E, E-37001 Salamanca (ES).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03196</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Mai 1999 (10.05.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 23 834.7      28. Mai 1998 (28.05.98)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ALTHÖFER, Henning [DE/DE]; Mainstrasse 12, D-67117 Limburgerhof (DE). SEULBERGER, Harald [DE/DE]; Im Speyerer Wingert 25, D-67141 Neuhofen (DE). ZELDER, Oskar [DE/DE]; Rossmarktstrasse 27, D-67346 Speyer (DE). REVUELTA DOVAL, Jose Luis [ES/ES]; Grillo 11, 4 E, E-37001 Salamanca (ES).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>			

(54) Title: GENETIC METHOD FOR PRODUCING RIBOFLAVIN

(54) Bezeichnung: GENETISCHES VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON RIBOFLAVIN



(57) Abstract

The invention relates to a genetic method for producing riboflavin. The production of riboflavin in organisms is increased by specially selecting genes of the riboflavin biosynthesis or of the combination thereof in organisms, especially in bacteria, fungi, yeasts and plants, and of the expression thereof. The invention also relates to a nucleic acid fragment containing genes with the sequences SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 or SEQ ID No. 5 or the functional equivalents thereof, to expression vectors containing the nucleic acid fragments, and to organisms containing at least one nucleic acid fragment or at least one vector.

# (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein genetisches Verfahren zur Herstellung von Riboflavin. Durch die spezielle Auswahl von Genen der Riboflavinbiosynthese bzw. deren Kombination in Organismen, speziell in Bakterien, Pilzen, Hefen und Pflanzen und deren Expression, wird die Riboflavinproduktion in diesen Organismen gesteigert. Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäurefragment enthaltend Gene mit den Sequenzen SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 5 oder deren funktionellen Äquivalente, Expressionsvektoren enthaltend die Nukleinsäurefragmente und Organismen enthaltend mindestens ein Nukleinsäurefragment oder mindestens einen Vektor.

## LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

## Genetisches Verfahren zur Herstellung von Riboflavin

### Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein genetisches Verfahren zur Herstellung von Riboflavin. Durch die spezielle Auswahl von Genen der Riboflavinbiosynthese bzw. deren Kombination in Organismen speziell in Bakterien, Pilzen, Hefen und Pflanzen und deren

10 Expression wird die Riboflavinproduktion in diesen Organismen gesteigert.

Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäurefragment enthaltend Gene mit den Sequenzen SEQ ID NO. 1, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID

15 No. 5 oder deren funktionellen Äquivalente, Expressionsvektoren enthaltend die Nukleinsäurefragmente und Organismen enthaltend mindestens ein Nukleinsäurefragment oder mindestens einen Vektor.

Vitamin-B2, auch Riboflavin genannt, wird von allen Pflanzen und  
20 einer Vielzahl von Mikroorganismen hergestellt. Für Mensch und Tier ist es essentiell, da sie nicht in der Lage sind, es zu synthetisieren. Riboflavin spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus. So ist es beispielsweise an der Verwertung von Kohlenhydraten beteiligt. Bei Vitamin B2-Mangel treten Entzündungen der

25 Mund- und Rachenschleimhäute, Juckreiz und Entzündungen in den Hautfalten und ähnliche Hautschäden, Bindehautentzündungen, verminderte Sehschärfe und Trübung der Hornhaut auf. Bei Säuglingen und Kindern können Wachstumsstillstand und Gewichtsabnahme auftreten. Vitamin-B2 hat deshalb eine große wirtschaftliche Bedeutung  
30 beispielsweise als Vitaminpräparat bei Vitaminmangel sowie als Futtermittelzusatz. Es wird verschiedensten Lebensmitteln zugesetzt. Daneben wird es auch als Lebensmittelfarbstoff, beispielsweise in Mayonnaise, Eiscreme, Pudding etc. verwendet.

35 Die Herstellung von Vitamin B2 erfolgt entweder chemisch oder mikrobiell (siehe z.B. Kurth et al., 1996, Riboflavin, in: Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry, VCH Weinheim). Bei den chemischen Herstellverfahren wird Riboflavin in der Regel in mehrstufigen Prozessen als reines Endprodukt gewonnen, wobei  
40 relativ kostspielige Ausgangsprodukte, wie z.B. D-Ribose, eingesetzt werden müssen.

Eine Alternative zur chemischen Synthese von Riboflavin ist die fermentative Herstellung des Vitamin B2 durch Mikroorganismen.

45 Als Ausgangsstoffe dienen dabei nachwachsende Rohstoffe, wie Zucker oder pflanzliche Öle. Die Herstellung von Riboflavin durch Fermentation von Pilzen wie *Eremothecium ashbyii* oder *Ashbya*

gossypii ist bekannt (The Merck Index, Windholz et al., eds. Merck & Co., Seite 1183, 1983), aber auch Hefen, wie z.B. *Candida*, *Pichia* und *Saccharomyces* oder Bakterien, wie z.B. *Bacillus*, *Clostridien* oder *Corynebakterien* sind als Riboflavin-Produzenten  
5 beschrieben. In EP-A-0 405 370 und EP-A-0 821 063 wird die Herstellung von Riboflavin mit rekombinanten Bakterienstämmen beschrieben, wobei die Stämme durch Transformation mit Riboflavin-Biosynthesegenen aus *Bacillus subtilis* erhalten wurden.

10 In Patent WO 95/26406 bzw. WO 93/03183 sowie in DE 44 20 785 wird die Klonierung der für die Riboflavin-Biosynthese spezifischen Gene aus den eukaryontischen Organismen *Ashbya gossypii* bzw. *Saccharomyces cerevisiae*, sowie Mikroorganismen, die mit diesen Genen transformiert wurden, und die Verwendung solcher Mikro-  
15 organismen zur Riboflavinsynthese beschrieben.

In beiden Organismen katalysieren 6 Enzyme ausgehend von Guanosintriphosphat (GTP) und von Ribulose-5-Phosphat die Bildung von Riboflavin. Hierbei setzt die GTP-Cyclohydrolase-II (rib1-Gen-  
20 produkt) GTP zu 2,5-Diamino-6-(ribosylamino)-4-(3H)-pyrimidinon-5-phosphat um. Diese Verbindung wird anschließend durch die 2,5-Diamino-6-(ribosylamino)-4-(3H)-pyrimidinon-5-phosphat Reduktase (rib7 Genprodukt) zu 2,5-Diamino-ribitylamino-2,4-(1H,3H)-pyrimidin-5-phosphat reduziert und dann durch eine spezifische  
25 Deaminase (rib2-Genprodukt) zu 5-Amino-6-ribitylamino-2,4-(1H,3H)-pyrimidindion-5-phosphat deaminiert. Durch eine unspezifische Phosphatase wird daraufhin das Phosphat abgespalten.

Ribulose-5-phosphat, neben GTP das zweite Ausgangsprodukt der  
30 letzten enzymatischen Schritte der Riboflavinbiosynthese, wird durch die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase (rib3-Genprodukt) zu 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (DBP) umgesetzt.

Sowohl DBP als auch 5-Amino-6-ribitylamino-2,4-(1H,3H)-Pyrimidindion sind die Edukte der enzymatischen Synthese von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Diese Reaktion wird durch das rib4-Gen-  
35 produkt (DMRL-Synthase) katalysiert. DMRL wird daraufhin durch die Riboflavin-Synthase (rib5-Genprodukt) zu Riboflavin umgesetzt (Bacher et al. (1993), Bioorg. Chem. Front. Vol. 3, Springer  
40 Verlag).

Trotz dieser Fortschritte in der Herstellung von Riboflavin besteht nach wie vor ein Bedarf zur Verbesserung und Steigerung der Vitamin B2-Produktivität um den steigenden Bedarf zu decken  
45 und die Herstellung von Riboflavin effizienter zu gestalten.

Es bestand daher die Aufgabe die Vitamin B2-Produktivität weiter zu verbessern. Diese Aufgabe wurde durch ein Verfahren zur gesteigerten Herstellung von Riboflavin mit einem Organismus, der in der Lage ist Riboflavin zu synthetisieren, dadurch gekennzeichnet, daß man die Aktivität der Enzyme 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase, Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase und Riboflavin-Synthase oder deren Funktionsanalogen im Organismus erhöht, gelöst. Vorteilhaft wird das Verfahren zur gesteigerten Herstellung von Riboflavin mit einem Organismus, der in der Lage ist Riboflavin zu synthetisieren, durchgeführt, der zusätzlich die Kombination der Gene, die für die Enzyme 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase (= rib3-Genprodukt), Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase (= rib4-Genprodukt) und Riboflavin-Synthase (= rib5-Genprodukt) oder deren Funktionsanalogen kodieren, enthält.

Weiter vorteilhaft zur Steigerung der Vitamin-B2-Produktivität ist die Kombination von Steigerung der natürlichen Enzymaktivität und Einbringen der oben genannten Genkombination zur Erhöhung der Genexpression.

Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich prinzipiell alle Organismen, die in der Lage sind Riboflavin zu synthetisieren. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Riboflavin synthetisieren können. Aber auch Organismen, die aufgrund des Einbringens der kompletten Vitamin B2-Synthesegene in der Lage sind Riboflavin zu synthetisieren, sind für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet. Für das erfindungsgemäße Verfahren sind Organismen wie Bakterien, Hefen, Pilze oder Pflanzen geeignet. Beispielhaft seien eukaryontische Organismen wie Pilze, die in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschrieben werden, wie *Ashbya* oder *Eremothecium*, Hefen wie *Candida*, *Saccharomyces* oder *Pichia* oder Pflanzen wie *Arabidopsis*, Tomate, Kartoffel, Mais, Soja, Raps, Gerste, Weizen, Roggen, Reis, Hirse, Baumwolle, Zuckerrübe, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Canola, Hafer, Tabak, Alfalfa, Salat oder die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies oder prokaryontische Organismen wie gram-positive oder gram-negative Bakterien wie *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Cyanobacter*, *Escherichia* oder *Klebsiella* genannt. Bevorzugt werden Organismen ausgewählt aus der Gruppe der Gattungen *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Ashbya*, *Eremothecium*, *Candida* oder *Saccharomyces* oder Pflanzen wie Mais, Soja, Raps, Gerste, Weizen, Kartoffel oder Tomate. Besonders bevorzugt werden Organismen der Gattung und Art *Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida flaveri*, *Candida famata*, *Corynebakterium ammoniagenes* oder *Bacillus*

subtilis. Als Pflanzen werden besonders bevorzugt Mais, Soja, Raps, Gerste, Weizen, Kartoffel und Tomate.

Die erfindungsgemäße Kombination der rib-Gene rib3, rib4 und rib5  
5 und/oder die Aktivitätserhöhung der Gene und ihrer Genprodukte  
führt zu einer deutlich gesteigerten Riboflavin-Produktivität.  
Die genannten Gene lassen sich prinzipiell über alle dem Fachmann  
bekannten Methoden in die verwendeten Organismen einführen, vor-  
teilhaft werden sie über Transformation, Transfektion, Elektro-  
10 poration, mit der sog. Partikelgun oder über Mikroinjektion in  
die Organismen bzw. deren Zellen eingebracht. Für Mikroorganismen  
kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von  
Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory  
manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel  
15 et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley  
and Sons, von D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL  
Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) Methods in  
Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Guthrie  
et al. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in  
20 Enzymology, 1994, Academic Press entnehmen. Als vorteilhaft seien  
beispielhaft Methoden wie das Einbringen der DNA über homologe  
oder heterologe Rekombination beispielsweise mit Hilfe des  
ura-3-Gens, speziell des ura-3-Gens von Ashbya, wie in der  
deutschen Anmeldung DE 19801120.2 beschrieben und/oder über die  
25 im folgenden beschriebene REMI-Methode (= "Restriktion-Enzyme-  
Mediated-Integration"), genannt.

Die REMI-Technik basiert auf der Kotransformation eines linearen  
DNA-Konstruktes, das an beiden Enden mit derselben Restriktions-  
30 endonuklease geschnitten wurde, zusammen mit der Restriktions-  
endonuklease, die für diese Restriktion des DNA-Konstrukts ver-  
wendet wurde, in einen Organismus. Die Restriktionsendonuklease  
schneidet daraufhin die genomische DNA des Organismus, in den  
das DNA-Konstrukt zusammen mit dem Restriktionsenzym eingebracht  
35 wurde. Dies führt zu einer Aktivierung der zelleigenen Reparatur-  
mechanismen. Diese Reparaturmechanismen reparieren die durch die  
Endonuklease hervorgerufene Strangbrüche der genomischen DNA und  
bauen dabei mit einer gewissen Frequenz auch das kotransformierte  
DNA-Konstrukt mit ins Genom ein. In der Regel bleiben dabei die  
40 Restriktionsschnittstellen an beiden Enden der DNA erhalten.

Diese Technik wurde von Bölker et al. (Mol Gen Genet, 248, 1995:  
547-552) für die Insertionsmutagenese von Pilzen beschrieben.  
Von Schiestl und Petes (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1991:  
45 7585-7589) wurde die Methode zur Aufklärung, ob es bei Saccharo-  
myces eine heterologe Rekombination gibt, verwendet. Zur stabilen  
Transformation und regulierten Expression eines induzierbaren

Reportergens wurde die Methode von Brown et al. (Mol. Gen. Genet. 251, 1996: 75-80) beschrieben. Das System wurde bisher noch nicht als gentechnisches Werkzeug zur Optimierung von Stoffwechselwegen oder zur kommerzielle Überexpression von Proteinen eingesetzt.

5

- Am Beispiel der Riboflavinsynthese wurde gezeigt, daß mit Hilfe der REMI-Methode Biosynthesegene in das Genom der oben genannten Organismen integriert werden kann und damit Produktionsverfahren zur Herstellung von Stoffwechselprodukten des Primär- oder Sekundärmetabolismus speziell von Biosynthesewegen beispielsweise von Aminosäuren wie Lysin, Methionin, Threonin oder Tryptophan, Vitaminen wie Vitamin A, B2, B6 B12, C, D, E, F, S-Adenosylmethionin, Biotin, Panthotensäure oder Folsäure, Carotinoiden wie  $\beta$ -Carotin, Lycopin, Canthaxanthin, Astaxanthin oder Zeaxanthin oder Proteinen wie Hydrolasen wie Lipasen, Esterasen, Amidasen, Nitrilasen, Proteasen, Mediatoren wie Cytokine z.B. Lymphokine wie MIF, MAF, TNF, Interleukine wie Interleukin 1, Interferone wie  $\gamma$ -Interferon, tPA, Hormone wie Proteohormone, Glykohormone, Oligo- oder Polypeptidhormone wie Vassopressin, Endorphine, Endostatin, Angiostatin, Wachstumsfaktoren Erythropoietin, Transkriptionsfaktoren, Integrine wie GPIIb/IIIa oder  $\alpha_v\beta_{III}$ , Rezeptoren wie die verschiedenen Glutamaterezeptoren, Angiogenesefaktoren wie Angiotensin optimiert werden können.
- 25 Mit Hilfe der REMI-Methode können die erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmente oder andere der oben genannten Gene an transcriptionsaktive Stellen im Genom plaziert werden.

- Vorteilhafterweise werden die Nukleinsäuren zusammen mit einem mindestens einem Reporter gen in ein DNA-Konstrukt kloniert, das in das Genom eingebracht wird. Dieses Reporter gen sollte eine leichte Detektierbarkeit über einen Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo- oder Biolumineszenzassay oder über eine photometrische Messung ermöglichen. Beispielhaft seien als Reporter gene Anti-
- 35 biotikaresistenzgene, Hydrolasegene, Fluoreszenzproteingene, Biolumineszenzgene, Glucosidasegene, Peroxidasegen oder Biosynthesegene wie die Riboflavingene, das Luciferasegen,  $\beta$ -Galactosidasegen, gfp-Gen, Lipasegen, Esterasegen, Peroxidasegen,  $\beta$ -Lactamasegen, Acetyl-, Phospo- oder Adenyltransferasegen
- 40 genannt. Diese Gene ermöglichen eine leichte Messbarkeit und Quantifizierbarkeit der Transcriptionsaktivität und damit der Expression der Gene. Damit lassen sich Genomstellen identifizieren, die eine bis zu Faktor 2 unterschiedliche Produktivität zeigen (siehe Figur 1). Figur 1 zeigt die Klone ITA-GS-15.2,
- 45 ITA-GS-17.1 und ITA-GS-01, die nach Integration erhalten wurden, mit ihren unterschiedlichen Vitamin B2- (= Riboflavin)Produktivitäten.

Im Falle, daß die Biosynthesegene selber eine leichte Detektierbarkeit ermöglichen, kann wie beispielsweise im Falle des Riboflavins auf ein zusätzliches Reportergen verzichtet werden.

- 5 Sollen mehrere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen mit einem Reportergen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen mit einem Reportergen in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht  
10 werden können. Auch Genfragmente, die für die jeweiligen Aktivitäten kodieren können in der REMI-Technik eingesetzt werden.

- Für das erfindungsgemäße Verfahren zur Integration von Biosynthesegenen in das Genom von Organismen eignen sich prinzipiell  
15 alle bekannten Restriktionsenzyme. Restriktionsenzyme, die nur 4 Basenpaare als Restriktionsschnittstelle erkennen, sind weniger bevorzugt, da sie zu häufig im Genom oder im zu integrierenden Vektor schneiden, bevorzugt sind Enzyme die 6, 7, 8 oder mehr Basenpaare als Schnittstelle erkennen wie BamHI, EcoRI, BglII,  
20 SphI, SpeI, XbaI, XhoI, NcoI, SalI, ClaI, KpnI, HindIII, SacI, PstI, BpnI, NotI, SrfI oder SfiI um nur einige der möglichen Enzyme zu nennen. Von Vorteil ist, wenn die verwendeten Enzyme keine Schnittstellen mehr in der einzuführenden DNA haben, dies erhöht die Effizienz der Integration. In der Regel werden 5 bis  
25 500 U, bevorzugt 10 bis 250, besonders bevorzugt 10 bis 100 U der Enzyme im REMI-Ansatz verwendet. Die Enzyme werden vorteilhaft in einer wäßrigen Lösung eingesetzt, die Substanzen zur osmotischen Stabilisierung wie Zucker wie Saccharose, Trehalose oder Glucose, Polyole wie Glycerin oder Polyethylenglycol, eine Puffer mit  
30 einer vorteilhaften Pufferung im Bereich von pH 5 bis 9, bevorzugt 6 bis 8, besonders bevorzugt 7 bis 8 wie Tris, MOPS, HEPES, MES oder PIPES und/oder Substanzen zur Stabilisierung der Nukleinsäuren enthalten wie anorganische oder organische Salze von Mg, Cu, Co, Fe, Mn oder Mo. Es können gegebenenfalls noch  
35 weitere Stoffe enthalten sein wie EDTA, EDDA, DTT,  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Nukleasehemmstoffe. Es ist aber auch möglich die REMI-Technik ohne diese Zusätze durchzuführen.

- Das erfindungsgemäße Verfahren wird in einem Temperaturbereich  
40 von 5 bis 80°C, bevorzugt von 10 bis 60°C, besonders bevorzugt von 20 bis 40°C durchgeführt. Für das Verfahren eignen sich alle bekannten Methoden zur Destabilisierung von Zellmembranen wie beispielsweise die Elektroporation, die Fusion mit beladenen Vesikeln oder die Destabilisierung über verschiedene Alkali- oder  
45 Erdalkalisalze wie Lithium, Rubidium- oder Calciumsalze bevorzugt sind die Lithiumsalze.



Die Nukleinsäuren können nach dem Isolieren direkt oder nach Aufreinigung für die erfindungsgemäße Reaktion verwendet werden.

Die Figuren 2 und 3 geben das erfindungsgemäße Verfahren in einem schematischen Überblick für die Integration der erfindungsgemäßen rib-Genkombination wieder. Die DNA wurde mit dem Enzym SpeI geschnitten und in seiner Gegenwart wurde die DNA in die Organismen eingeführt. Zur leichteren Selektion wurde ein Kanamycin-Resistenzgen im Fragment mit eingebaut, das von TEF-Promotoren-Sequenzen flankiert ist (sog. "direct repeat"). Über diese Sequenzen wird das Resistenzgen über eine Rekombination wieder entfernt (siehe Figur 3).

Das Einbringen der erfindungsgemäßen Kombination der rib-Gene in Pflanzen kann prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, die Verwendung einer Genkanone, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225 beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711). Die Transformation von Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* wird beispielsweise von Höfgen und Willmitzer in Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 beschrieben.

Mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies sowie Leguminosen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke

in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem  
5 Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten die Enzymaktivität der  
10 rib-Genprodukte in der Zelle zu erhöhen.

Eine Möglichkeit besteht darin, die endogenen rib-Gene 3,4 und 5 so zu verändern, daß sie für Enzyme mit gegenüber den Ausgangsenzymen erhöhter rib 3,4 bzw.5-Aktivität kodieren. Eine andere  
15 Erhöhung der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem durch Veränderung der katalytischen Zentren ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzym-inhibitoren aufgehoben wird, das heißt sie weisen eine erhöhte spezifische Aktivität auf oder ihre Aktivität wird nicht gehemmt.  
20 Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität in einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform durch Erhöhung der Enzymsynthese in der Zelle erfolgen, beispielsweise durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzymsynthese reprimieren oder durch Erhöhung der Aktivität von Faktoren oder Regulatorelementen, die eine verstärkte  
25 Synthese fördern, oder bevorzugt durch Einbringen weiterer Genkopien. Durch diese Maßnahmen wird die Gesamtaktivität der Genprodukte in der Zelle erhöht, ohne die spezifische Aktivität zu verändern. Es kann auch eine Kombination dieser Methoden verwendet werden, das heißt Erhöhung der spezifischen Aktivität sowie  
30 Erhöhung der Gesamtaktivität. Diese Änderungen können prinzipiell über alle dem Fachmann bekannten Methoden in die Nukleinsäuresequenzen der Gene, Regulationselemente oder deren Promotoren eingebracht werden. Hierzu können die Sequenzen beispielsweise einer Mutageneses wie einer "site directed mutagenesis" unter-  
35 zogen werden wie sie in D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), Kapitel 6, Seite 193 ff beschrieben wird.

Von Spee et al. (Nucleic Acids Research, Vol. 21, No. 3, 1993:  
40 777 - 778) wird eine PCR-Methode unter Verwendung von dITP zur zufälligen Mutagenese beschrieben.

Die Verwendung einer "in vitro" Rekombinationstechnik für die molekulare Evolution wird von Stemmer (Proc. Natl. Acad. Sci.  
45 USA, Vol. 91, 1994: 10747 - 10751) beschrieben.

Von Moore et al. (Nature Biotechnology Vol. 14, 1996: 458 - 467) wird die Kombination der PCR- und Rekombinationsmethode beschrieben.

- 5 Die veränderten Nukleinsäuresequenzen werden anschließend wieder über Vektoren in die Organismen zurückgebracht.

Es können zur Erhöhung der Enzymaktivitäten auch veränderte Promotorbereiche vor die natürlichen Gene gebracht werden, so daß  
10 die Expression der Gene gesteigert wird und damit die Aktivität letztlich angehoben wird. Auch am 3'-Ende können Sequenzen eingebracht werden, die beispielsweise die Stabilität der mRNA erhöhen und dadurch eine erhöhte Translation ermöglichen. Dies führt ebenfalls zu einer höheren Enzymaktivität.

- 15 Vorzugsweise werden weitere Genkopien der rib-Gene 3,4 und 5 gemeinsam in die Zelle eingebracht. Diese Genkopien können der natürlichen Regulation unterliegen, einer veränderten Regulation, wobei die natürlichen Regulationsregionen derart verändert wurden,  
20 das sie eine erhöhte Expression der Gene ermöglicht oder aber es können Regulationssequenzen fremder Gene oder sogar artfremder Gene verwendet werden.

- Besonders vorteilhaft ist eine Kombination der oben genannten  
25 Methoden.

Unter Funktionsanalogen sind beispielsweise funktionelle Homologe der rib-Gene oder deren enzymatischen Aktivitäten, das heißt Enzyme, die dieselben enzymatischen Reaktionen wie die rib-Gene  
30 katalysieren, zu verstehen. Diese Gene führen ebenfalls zu einer vorteilhaften Erhöhung der Riboflavinbildung. Auch diese Funktionsanalogen können in der oben genannten Art vorteilhaft mutagenisiert bzw. verändert und damit ihre Aktivität gesteigert werden.

- 35 Die Funktionsanalogen sind vorteilhaft Gene oder Genprodukte, die beispielsweise aus eukaryontischen oder prokaryontischen Organismen stammen. Als eukaryontische Organismen seien beispielhaft Pilze, die in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995)  
40 auf Seite 15, Tabelle 6 beschrieben werden, wie Eremothecium, Hefen wie Candida, Saccharomyces oder Pichia oder Pflanzen wie Arabidopsis, Tomate, Kartoffel, Mais, Soja, Raps, Gerste, Weizen, Roggen, Reis, Hirse, Baumwolle, Zuckerrübe, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Canola, Hafer, Tabak, Alfalfa, Salat oder die verschiedenen  
45 Baum-, Nuß- und Weinspezies genannt. Als prokaryontische Organismen seien beispielhaft gram-positive oder gram-negative Bakterien genannt wie Corynebacterium, Brevibacterium, Bacillus, Clostri-

## 10

dium, Cyanobacter oder Escherichia genannt. Vorteilhaft stammen die Funktionsanalogen aus Pilzen wie Eremothecium, Hefen wie Saccharomyces oder Candida, gram-positiven Bakterien wie Bacillus oder Corynebacterium oder gram-negative Bakterien wie Escherichia coli. Bevorzugt stammen die Funktionsanalogen aus den Organismen der Gattung und Art Eremothecium ashbyii, Saccharomyces cerevisiae, Candida flaveri, Candida famata, Escherichia coli, Corynebacterium ammoniagenes oder Bacillus subtilis.

- 10 Vorteilhaft im erfindungsgemäßen Verfahren ist die Kombination der Gene mit den Sequenzen SEQ ID No.1, SEQ ID No.3 und SEQ ID No.5 oder deren funktionelle Äquivalente.

- Unter funktionellen Äquivalenten der in der erfindungsgemäßen Kombination verwendeten Gene mit den Sequenzen SEQ ID No.1, SEQ ID No.3 und SEQ ID No.5 sind beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 35 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, bevorzugt mindestens 40 % Homologie, besonders bevorzugt mindestens 45 % Homologie, ganz besonders bevorzugt 50 % Homologie aufweisen. Die von den genannten Nukleinsäuren abgeleitete Aminosäuresequenz ist den Sequenzen SEQ ID No.2, SEQ ID No.4 und SEQ ID No.6 zu entnehmen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus den in SEQ ID No.1, SEQ ID No.3 und SEQ ID No.5 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine erhalten bleibt.

- Solche DNA-Sequenzen lassen sich ausgehend von den in SEQ ID No.1, SEQ ID No.3 und SEQ ID No.5 beschriebenen DNA-Sequenzen oder Teilen dieser Sequenzen, beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Eukaryonten oder Prokaryonten als Ashbya gossypii wie oben genannt isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den genannten Sequenzen. Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide der konservierten Bereich, die über Vergleiche mit den entsprechenden Genen aus E. coli und B. subtilis in dem Fachmann bekannterweise ermittelt werden können, verwendet.

- 40 Unter Standardbedingungen sind beispielsweise Temperaturen zwischen 42 und 58 °C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50% Formamid wie beispielsweise 42 °C in 5 x SSC und in Gegenwart von 50% Formamid zu verstehen. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind einschlägigen Lehrbüchern der Genetik

wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben.

Weiterhin sind unter Homologe der Sequenzen SEQ ID No.1, SEQ ID  
5 No.3 und SEQ ID No.5 beispielsweise eukaryontische oder prokaryontische Homologe, verkürzte Sequenzen oder Einzelstrang-DNA zu verstehen.

Außerdem sind unter Homologe der Sequenzen SEQ ID No.1, SEQ ID  
10 No.3 und SEQ ID No.5 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Die Promotoren, die den angegebenen Nukleotidsequenzen gemeinsam oder einzeln vorgeschaltet sind, können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des  
15 weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

20 Unter Derivaten sind auch vorteilhaft Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz vor dem Startkodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird.

25 Bevorzugt lassen sich Sequenzen SEQ ID No.1, SEQ ID No.3 und SEQ ID No.5 oder ihre funktionellen Äquivalente aus Mikroorganismen der Gattungen Clostridium, Corynebacterium, Brevibacterium, Cyanobacter, Bacillus, Eremothecium, Escherichia, Pichia, Ashbya oder Candida oder aus Pflanzen, besonders bevorzugt aus Mikroorganismen der Gattung und Art Bacillus subtilis, Corynebakterium  
30 ammoniagenes, Escherichia coli, Candida flaveri, Candida famata oder Pilzen, die in Indian Chem Engr. Section B., Vol.37, No. 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschrieben werden, wie z.B. Eremothecium ashbyii oder Ashbya gossypii, ganz besonders bevorzugt aus Mikroorganismen der Gattung und Art Eremothecium ashbyii  
35 oder Ashbya gossypii isolieren. So können beispielsweise die zu rib 3, 4, 5 homologen Gene rib A, ribH und ribB, oder Genfragmenten aus diesen, aus Bacillus subtilis oder die zu rib3, 4, 5 homologen Genen rib B, rib E und rib C, oder Genfragmenten aus  
40 diesen aus E. coli in prokaryotischen Systemen zur Steigerung der Riboflavin-Ausbeute im erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft verwendet werden.

Für eine optimale Expression heterologer Gene in Organismen ist  
45 es vorteilhaft die Nukleinsäuresequenzen entsprechend des im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" zu verändern. Der "codon usage" läßt sich anhand von Computerauswertungen

anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

- Die Genexpression der rib-Gene 3, 4 und 5 kann vorteilhaft durch
- 5 Erhöhen der rib3,4,5 Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die rib3,4 und 5 Genexpression positiv beeinflussen, erhöht werden. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem stärkere Transkriptionssignale wie Promotoren und
- 10 Enhancer verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der rib3, 4 und 5 mRNA verbessert, oder die Ableseeffizienz dieser mRNA an den Ribosomen erhöht wird.
- 15 Zur Erhöhung der Genkopienzahl können die rib-Gene 3,4 und 5, oder homologer Gene, beispielsweise in ein Nukleinsäurefragment bzw. in einen Vektor eingebaut werden, der vorzugsweise die den jeweiligen rib-Genen zugeordnete, regulatorische Gensequenzen oder analog wirkende Promotoraktivität enthält.
- 20 Insbesondere werden solche regulatorische Sequenzen verwendet, die die Genexpression verstärken. Alternativ kann auch jedes der beschriebenen Gene in einen einzelnen Vektor gebracht und in den jeweiligen Produktionsorganismus transformiert werden.
- 25 Unter dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragment sind die rib-Gensequenzen SEQ ID No. 1, SEQ ID No.3 und SEQ ID No.5 oder deren funktionelle Äquivalente zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Gen-
- 30 expression funktionell verknüpft wurden. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nucleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche
- 35 Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen
- 40 Regulationssignale vor die Sequenzen SEQ ID No.1, SEQ ID No.3 oder SEQ ID No.5 oder deren funktionelle Äquivalente inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression
- 45 gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können auch allein vor die natürlichen Gene zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell

- verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nucleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren.
- 5 Die rib-Gene können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

- Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-,
- 10 tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-,  $\lambda$ -P<sub>R</sub>- oder im  $\lambda$ -P<sub>L</sub>-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder
- 15 Pilzpromotoren ADC1, MF $\alpha$ , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], PRP1 [Ward et al., Plant.Mol. Biol.22(1993)], SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, LEB4, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten. In diesem Zusammenhang sind
- 20 auch die Promotoren der Pyruvatdecarboxylase und der Methanoloxidase aus beispielsweise Hansenula vorteilhaft. Weitere vorteilhafte Pflanzenpromotoren sind beispielsweise ein durch Benzensulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2,397-404),
- 25 ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO9321334) Promotor. Vorteilhaft sind insbesondere solche pflanzliche Promotoren, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Purinen bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blatt-
- 30 spezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445-245). Auch der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nummer U87999) oder
- 35 einen anderen Nodien-spezifischen Promotor wie in EP 249676 können vorteilhaft verwandt werden.

- Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße
- 40 Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

- Im Nukleinsäurefragment (= Genkonstrukt) können wie oben beschrieben noch weitere Gene, die in die Organismen eingebracht
- 45 werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können unter getrennter Regulation oder unter der gleichen Regulationsregion wie die rib-Gene liegen. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um

weitere Biosynthesegene, die eine gesteigerte Synthese ermöglichen.

- Das Nukleinsäurefragment wird zur Expression in den oben genannten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, das eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1,  $\lambda$ gt11 oder pBdCI, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2 $\mu$ M, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLye23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac<sup>+</sup>, pBIN19, pAK2004 oder pDH51 oder Derivate der vorstehend genannten Plasmide. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Geeignete pflanzliche Vektoren werden unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben.
- Vorteilhafterweise enthält das Nukleinsäurefragment zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3' und/oder 5' Terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.
- Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.
- Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.
- In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann das erfindungsgemäße Genkonstrukt auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Mikroorganismen eingeführt werden und über



## 15

heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurefragment als Vektor bestehen.

5

Als Vektor kann auch ein beliebiges Plasmid (insbesondere aber ein Plasmid, das den Replikationsursprung des 2µm Plasmids aus *S. cerevisiae* trägt) verwendet werden, das in der Zelle autonom repliziert, aber auch wie oben beschrieben ein lineares DNA-

- 10 Fragment, das in das Genom des Wirtes integriert. Diese Integration kann über hetero- oder homologe Rekombination erfolgen. Bevorzugt wie erwähnt jedoch über homologe Rekombination (Steiner et al., Genetics, Vol. 140, 1995: 973 - 987). Dabei können die Gene *rib3*, *rib4* und *rib5* einzeln im Genom an verschiedenen Orten  
15 oder auf verschiedenen Vektoren vorliegen oder gemeinsam im Genom oder auf einem Vektor vorliegen.

- Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Organismen, die die Kombination der *rib*-Gene 3,4 und 5 oder deren funktionelle  
20 Äquivalente enthalten, zeigen eine erhöhte Riboflavin-Produktion.

- Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die für die Herstellung von Riboflavin verwendeten Organismen in einem Medium, das das Wachstum dieser Organismen ermöglicht, angezüchtet. Dieses Medium kann  
25 ein synthetisches oder ein natürliches Medium sein. Je nach Organismus werden dem Fachmann bekannte Medien verwendet. Für das Wachstum der Mikroorganismen enthalten die verwendeten Medien eine Kohlenstoffquelle, eine Stickstoffquelle, anorganische Salze und gegebenenfalls geringe Mengen an Vitamine und Spurenelemente.

30

- Vorteilhafte Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Zucker wie Mono-, Di- oder Polysaccharide wie Glucose, Fructose, Mannose, Xylose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose, komplexe Zucker-  
35 quellen wie Melasse, Zuckerphosphate wie Fructose-1,6-bisphosphat, Zuckeralkohole wie Mannit, Polyole wie Glycerin, Alkohole wie Methanol oder Ethanol, Carbonsäuren wie Citronensäure, Milchsäure oder Essigsäure, Fette wie Sojaöl oder Rapsöl, Aminosäuren wie ein Aminosäurengemisch beispielsweise sog.  
40 Casamino acids (Difco) oder einzelne Aminosäuren wie Glycin oder Asparaginsäure oder Aminosucker, die letztgenannten können auch gleichzeitig als Stickstoffquelle verwendet werden.

- Vorteilhafte Stickstoffquellen sind organische oder anorganische  
45 Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispiele sind Ammoniumsalze wie  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oder  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Nitrate, Harnstoff, oder komplexe Stickstoffquellen wie Maisquell-

wasser, Bierhefeautolysat, Sojabohnenmehl, Weizengluten, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Caseinhydrolysat, Hefe oder Kartoffelprotein, die häufig auch gleichzeitig als Stickstoffquelle dienen können.

5

Beispiele für anorganische Salze sind die Salze von Calcium, Magnesium, Natrium, Cobalt, Molybdän, Mangan, Kalium, Zink, Kupfer und Eisen. Als Anion dieser Salze sind besonders das Chlor-, Sulfat- und Phosphation zu nennen. Ein wichtiger Faktor zur Steigerung der Produktivität im erfindungsgemäßen Verfahren ist die Kontrolle der  $\text{Fe}^{2+}$ - oder  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionenkonzentration im Produktionsmedium.

Gegebenenfalls werden dem Nährmedium weitere Wachstumsfaktoren zugesetzt, wie beispielsweise Vitamine oder Wachstumsförderer wie Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nicotinsäure, Pantothenat oder Pyridoxin, Aminosäuren wie Alanin, Cystein, Prolin, Asparaginsäure, Glutamin, Serin, Phenylalanin, Ornithin oder Valin, Carbonsäuren wie Citronensäure, Ameisensäure, Pimelinsäure oder Milchsäure, oder Substanzen wie Dithiothreitol.

Das Mischungsverhältnis der genannten Nährstoffe hängt von der Art der Fermentation ab und wird im Einzelfall festgelegt. Die Mediumkomponenten können alle zu Beginn der Fermentation vorgelegt werden, nachdem sie falls erforderlich getrennt sterilisiert oder gemeinsam sterilisiert wurden, oder aber je nach Bedarf während der Fermentation kontinuierlich oder diskontinuierlich nachgegeben werden.

Die Züchtungsbedingungen werden so festgelegt, daß die Organismen optimal wachsen und daß die bestmöglichen Ausbeuten erreicht werden. Bevorzugte Züchtungstemperaturen liegen bei 15 °C bis 40 °C. Besonders vorteilhaft sind Temperaturen zwischen 25 °C und 37 °C. Vorzugsweise wird der pH-Wert in einem Bereich von 3 bis 9 festgehalten. Besonders vorteilhaft sind pH-Werte zwischen 5 und 8. Im allgemeinen ist eine Inkubationsdauer von wenigen Stunden bis zu einigen Tagen bevorzugt von 8 Stunden bis zu 21 Tagen, besonders bevorzugt von 4 Stunden bis 14 Tagen ausreichend. Innerhalb dieser Zeit reichert sich die maximale Menge an Produkt im Medium an.

Wie Medien vorteilhaft optimiert werden können, kann der Fachmann beispielsweise dem Lehrbuch Applied Microbiol Physiology, "A Practical Approach" (Eds. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL-Press, 1997, Seiten 53 - 73, ISBN 0 19 963577 3) entnehmen. Vorteilhafte Medien und Anzuchtbedingungen sind für Bacillus und weitere Organismen beispielsweise der Schrift EP-A-0 405 370 speziell

dem Beispiel 9, für Candida der Schrift WO 88/09822 speziell Tabelle 3 und für Ashbya der Schrift von Schmidt et al. (Microbiology, 142, 1996: 419-426) zu entnehmen.

- 5 Das erfindungsgemäße Verfahren kann kontinuierlich oder diskontinuierlich in batch- oder fed-batch-weise durchgeführt werden.

- Abhängig davon wie hoch die Ausgangsproduktivität des verwendeten Organismus ist, läßt sich die Riboflavin-Produktivität durch das
- 10 erfindungsgemäße Verfahren unterschiedlich stark steigern. In der Regel läßt sich die Produktivität vorteilhaft um mindestens 5% , bevorzugt um mindestens 10%, besonders bevorzugt um 20%, ganz besonders bevorzugt um mindestens 100% jeweils gegenüber dem Ausgangsorganismus steigern.

15

Beispiele:

- Die Isolierung der rib-Gene 1,2,3,4,5 und 7 aus Ashbya gossypii und Saccharomyces cerevisiae wird in den Patenten WO 95/26406 und
- 20 WO 93/03183 und speziell in den Beispielen beschrieben und wurde entsprechend durchgeführt. Auf diese Schriften wird hier ausdrücklich Bezug genommen.

- Sequenz 1 zeigt das DNA-Konstrukt, das neben dem zur Trans-
- 25 formation notwendigen Selektionsmarker die Genfragmente von rib3, rib4 und rib5 trägt.

- Allgemeine Nukleinsäureverfahren wie z.B. Klonierung, Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Verknüpfen von DNA-
- 30 Fragmenten, Transformation von Mikroorganismen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wenn nichts anderes beschrieben wurde wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

35

- Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Ketten-
- 40 reaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

45

## Beispiel 1

Klonierung des DNA-Konstruktes, das die rib3, rib4 und rib5 Genkopien enthält (Vektor Tef-G418 rib3,4,5)

5

Expressionskonstrukte der rib-Gene: rib3 (Vektor pJR874), rib4 (Vektor pJR762) und rib5 (Vektor pJR739) werden in WO95/26406 beschrieben. Der Vektor pAG-110 (Steiner und Philipsen (1994) Mol. Gen. Genet., 242; 263-271) wurde mit DraIII geschnitten, mit

- 10 Klenowpolymerase und Desoxy-Nukleotiden inkubiert (Auffüllen der Enden), gefällt und anschließend mit SalI geschnitten. Das DNA-Fragment, das den Tef-Promotor und das Kanamycin-Resistenzgen enthält wurde mit dem HindIII und SalI geschnittenem Vektor Bluescript KS- (Stratagene), dessen HindIII Enden durch Klenow-
- 15 polymerase aufgefüllt waren ligiert. Es entstand der Vektor pBS Tef-G418.

pJR874 wurde im zweiten Klonierungsschritt mit PvuII und SalI geschnitten worden. Das rib3-Genfragment wurde daraufhin mit einem

20 SalI geschnittenen und dephosphorilierten Vektor pBS Tef-G418 ligiert. Da nur die SalI Enden des Fragments und Vektors ligiert werden konnten, sind die nicht-kompatiblen PvuII und SalI Enden mit Klenowpolymerase aufgefüllt und anschließend ligiert worden. Der entstandene Vektor wird im folgenden Tef-G418-rib3 genannt.

25

- Zur Subklonierung des rib5-Gens in den Vektor Tef-G418-rib3 wurde der Vektor pJR739 mit NcoI und NotI geschnitten. Die Enden wurden mit Klenowpolymerase aufgefüllt. Das rib5-Genfragment wurde dann in den mit SalI geschnittenen Vektor Tef-G418-rib3, dessen Enden
- 30 ebenfalls aufgefüllt waren subkloniert. Es entstand Vektor Tef-G418-Rib3,5.

Im letzten Klonierungsschritt wurde das rib4-Genfragment aus Vektor pJR762 durch PCR mit Hilfe der Primer

35

5' GATCGATCGATCGCTAGCTGGGAGGATATGTTCTGGG 3'

5' TCCAAGCTTGCTAGCATCTCAAATAAGTGATTAGAAGGACAAGCTGCAAG 3'

- 40 gewonnen. Das PCR-Fragmente wurde mit NheI geschnitten und in einen NheI geschnittenen und mit alkalischer Phosphatase behandelten Vektor Tef-G418rib3, 5 subkloniert.

- Das resultierende DNA-Konstrukt stellt den Vektor Tef-G418-rib3,
- 45 4, 5 dar.

## Beispiel 2

Transformation des DNA-Konstruktes in den Pilz *Ashbya gossypii*  
Das in Beispiel 1 beschriebene DNA-Konstrukt (Vektor Tef-  
5 G418-rib3,4,5) wurde mit dem Restriktionsenzym SpeI vollständig  
geschnitten und das Insert, das die rib-Gen Sequenzen trägt durch  
Agarosegelaufentrennung aufgereinigt. Das für die Transformation  
benutzte Insert wird in SEQ ID No.7 wiedergegeben. Die abge-  
leiteten Aminosäuresequenzen der im Insert vorhandenen rib-Gene  
10 3,4 und 5 sind den Sequenzen SEQ ID No.8 (= rib3), SEQ ID No.9  
(= rib5) und SEQ ID No.10 (= rib4) zu entnehmen.

MA2-Medium (10g/l Bacto-Peptide, 1g/l Hefeextrakt, 0,3g/l myo-  
Inositol und 10g/l D-Glucose) wurde mit *Ashbya gossypii* Sporen  
15 angeimpft. Die Kultur wurde 12 h bei 4°C und anschließend unter  
Schütteln für 13 h bei 28°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde  
abzentrifugiert und das Zellpellet in 5ml 50mM Kaliumphosphat-  
puffer pH 7,5, 25 mM DTT aufgenommen. Nach einer 30-minütigen  
Wärmebehandlung bei 28°C wurden die Zellen wiederum abzentrif-  
20 fugiert und in 25 ml STM-Puffer (270 mM Saccharose, 10 mM TRIS-  
HCl pH 7,5, 1mM MgCl<sub>2</sub>) aufgenommen. 0,5 ml dieser Suspension  
wurden dann mit ca. 3µg des oben aufgereinigten Inserts und 40 U  
SpeI Enzym versetzt und in einem Biorad Gene Pulser (100Ω, 20 µF,  
1,5kV) elektroporiert. Nach der Elektroporation sind die Zellen  
25 mit 1 ml MA2-Medium versetzt und auf MA2-Agarkulturplatten aus-  
gestrichen worden. Zur Antibiotikaselektion überschichtet man die  
Platten nach 5h Inkubation bei 28°C mit 5ml "Low-Melting"-Agarose,  
die das Antibiotikum G418 (200µg/ml) enthält. Die Transformanten  
wurden durch Mikromanipulation klonal aufgereinigt (Steiner und  
30 Philipsen (1995) Genetics, 140; 973-987). Die erfolgreiche Inte-  
gration des Konstrukts wurde durch PCR-Analyse der genomischen  
DNA der Transformanten verifiziert. Die Isolation der genomischen  
DNA wurde wie von Carle und Olson (Proc.Natl.Acad.Sci, 1985, 82,  
3756-3760) und Wright und Philipsen (Gene, 1991, 109,99-105)  
35 beschrieben durchgeführt. Die PCR mit für das Konstrukt spezi-  
fischen Primern ist nach R. Saiki (PCR Protocols, 1990, Academic  
Press, 13-20) durchgeführt worden. Die Analyse der PCR-Fragmente  
geschieht durch Auftrennung über ein Agarosegel. Die erfolgreiche  
Integration der DNA in des Genom der Transformanten wurde mit  
40 Hilfe der folgenden Primer durchgeführt:

Primer A: 5'-TCCCTTAATCATTGTCAGTGC-3',  
Primer B: 5'-CCAAGCTTGCTAGCATCTC-3',  
Primer C: 5'-CTGCCTGAGAAGCTGGAAAGC-3',  
45 Primer D: 5'-TGTGAATTAGTAAGCGAAAGG-3',  
Primer E: 5'-TAAGGGATTAGGCGAAGTTGA-3',  
Primer F: 5'-GCTGCCACCCCTCTGATTCAC-3',

Primer G: 5'-ATAAGCTTTTGCCATTCTCAC-3',

Primer H: 5'-CTTTTGCTTTGCCACGGAACG-3'.

Bei allen Transformanten konnte eine erfolgreiche Integration ins 5 Genom nachgewiesen werden.

### Beispiel 3

Riboflavinbestimmung im rekombinanten *Ashbya gossypii* Klon

- 10 *Ashbya gossypii* Ita-GS-01 (Schmidt, G., Stahmann, K.-P., Kaesler, B., & Sahm, H. (1996) Microbiology 142,419-426) und die daraus durch Transformation mit dem in Beispiel 1 beschriebenen Konstrukt hervorgegangenen Stamm Ita-GS-01#17.1 wurde auf Agarmedium bei 28°C 4 Tage lang angezogen. Von dieser Platte wurden drei
- 15 100 ml Erlenmeyerkolben mit 10 ml Medium (27,5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l MgSO<sub>4</sub>, 50 ml/l Sojaöl, pH 7,0) beimpft (17.1-1, 17.1-2, 17.1-3). Nach 40 h Stunden Inkubation bei 28°C, 180 rpm auf dem Schüttler wurde je 1 ml der Kulturbrühe in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml YPD-Medium überführt (10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l
- 20 Bactopepton, 20 g/l Glucose). Inkubation 28°C, 300 rpm. Nach 190 h wurde aus jedem Kolben eine 1 ml Probe entnommen und mit 1 ml 1 M Perchlorsäure versetzt. Die Probe wurde filtriert und der Riboflavingehalt mit HPLC-Analytik bestimmt. Dabei wurde eine Eichung mit Riboflavinstandards (10 mg/l, 20 mg/l, 30 mg/l, 40 mg/l,
- 25 50 mg/l) vorgenommen.

Parameter der HPLC-Methode zur Riboflavinbestimmung:

Säule	ODS Hypersil 5mm 200X 2,1mm (HP)
30 Eluent A	Wasser mit 340ml H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (89%) auf pH 2,3
Eluent B	100% Acetonitril
Gradient	
Stopzeit	100 - 6 min.: 2% B auf 50% B
35	6 - 6,5 min: 50 % B auf 2% Bmin
Fluß	0,5 ml/min
Detektion	280 nm
Temperatur	40°C
Injektion	2 - 10 µl

- 40 Alle drei Ansätze des Klon 17, der eine zusätzliche Genkopie der rib-Gene 3, 4 und 5 enthalten, zeigen im Vergleich zum Ausgangsstamm eine deutlich erhöhte Riboflavinproduktivität (Figur 4).

- 45 Figur 4 zeigt die Riboflavinausbeuten der verschiedenen Klone. Durch Einbringen der rib3,4 und 5 Gene konnten Steigerungen der Riboflavinausbeuten von bis zu 150% im Vergleich zum unmodifizierten Stamm erreicht werden.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur gesteigerten Herstellung von Riboflavin mit  
5 einem Organismus, der in der Lage ist Riboflavin zu synthetisieren, dadurch gekennzeichnet, daß man die Aktivität der Enzyme 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase, Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase und Riboflavin-Synthase oder deren Funktionsanalogen im Organismus erhöht.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Kombination der Gene, die für die Enzyme 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase, Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase und Riboflavin-Synthase oder deren  
15 Funktionsanalogen kodieren, zur Aktivitätssteigerung der Enzyme in den Organismus einbringt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus ein Bakterium, eine Hefe, einen Pilz  
20 oder eine Pflanze verwendet.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man Organismen ausgewählt aus der Gruppe der Gattungen Bacillus, Clostridium, Escherichia, Pichia,  
25 Candida, Cyanobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, Saccharomyces, Eremothecium oder Ashbya oder Pflanzen wie Arabidopsis, Tomate, Kartoffeln, Mais, Raps, Weizen, Gerste, Sonnenblumen, Hirse, Roggen, Hafer, Zuckerrübe, Bohnengewächse oder Soja verwendet.
- 30 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man Organismen ausgewählt aus der Gruppe der Gattungen Bacillus, Corynebacterium, Brevibacterium, Escherichia, Candida, Eremothecium oder Ashbya verwendet.
- 35 6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß Gene mit den Sequenzen SEQ ID NO. 1, SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 5 oder deren funktionellen Äquivalente verwendet werden.
- 40 7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Äquivalente eine Homologie auf der durch die Sequenzen kodierten und abgeleiteten Aminosäureebene von 35 % haben.
- 45

Zeichn.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene, die für die Enzyme 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase, Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase und Riboflavin-Synthase oder deren Funktionsanaloge  
5 kodieren, aus eukaryontischen oder prokaryontischen Organismen stammen.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene oder deren Äquivalente aus Organismen  
10 ausgewählt aus der Gruppe Bacillus, Escherichia, Clostridium, Saccharomyces, Candida, Eremothecium oder Ashbya stammen.
10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene oder deren Äquivalente zusammen  
15 oder getrennt auf mindestens einem Vektor oder chromosomal lokalisiert sind.
11. Nukleinsäurefragment enthaltend Gene mit den Sequenzen SEQ ID NO. 1, SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 5 oder deren funktionellen  
20 Äquivalente, wobei die Gene oder ihre Äquivalente funktionell mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft sind.
12. Expressionsvektor enthaltend das Nukleinsäurefragment gemäß Anspruch 11.  
25
13. Expressionsvektor nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine lineare Nukleinsäure handelt.
14. Organismus enthaltend mindestens ein Nukleinsäurefragment  
30 gemäß Anspruch 11 oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 12.
15. Verwendung einer Kombination der Gene, die für die Enzyme 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase, Dimethyl-8-  
35 ribityllumazin-Synthase und Riboflavin-Synthase oder deren Funktionsanalogen kodieren, in einen Organismus, der in der Lage ist Riboflavin zu synthetisieren, zur gesteigerten Herstellung von Riboflavin.
- 40 16. Verwendung nach Anspruch 15 in *Ashbya gossypii*.
17. Verfahren zur Integration von Nukleinsäuren in das Genom von Organismen, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens ein  
45 Riboflavinsynthesegen über eine Restriktionsenzym vermittelte Integration ins Genom des Organismus einführt.



Fig. 1

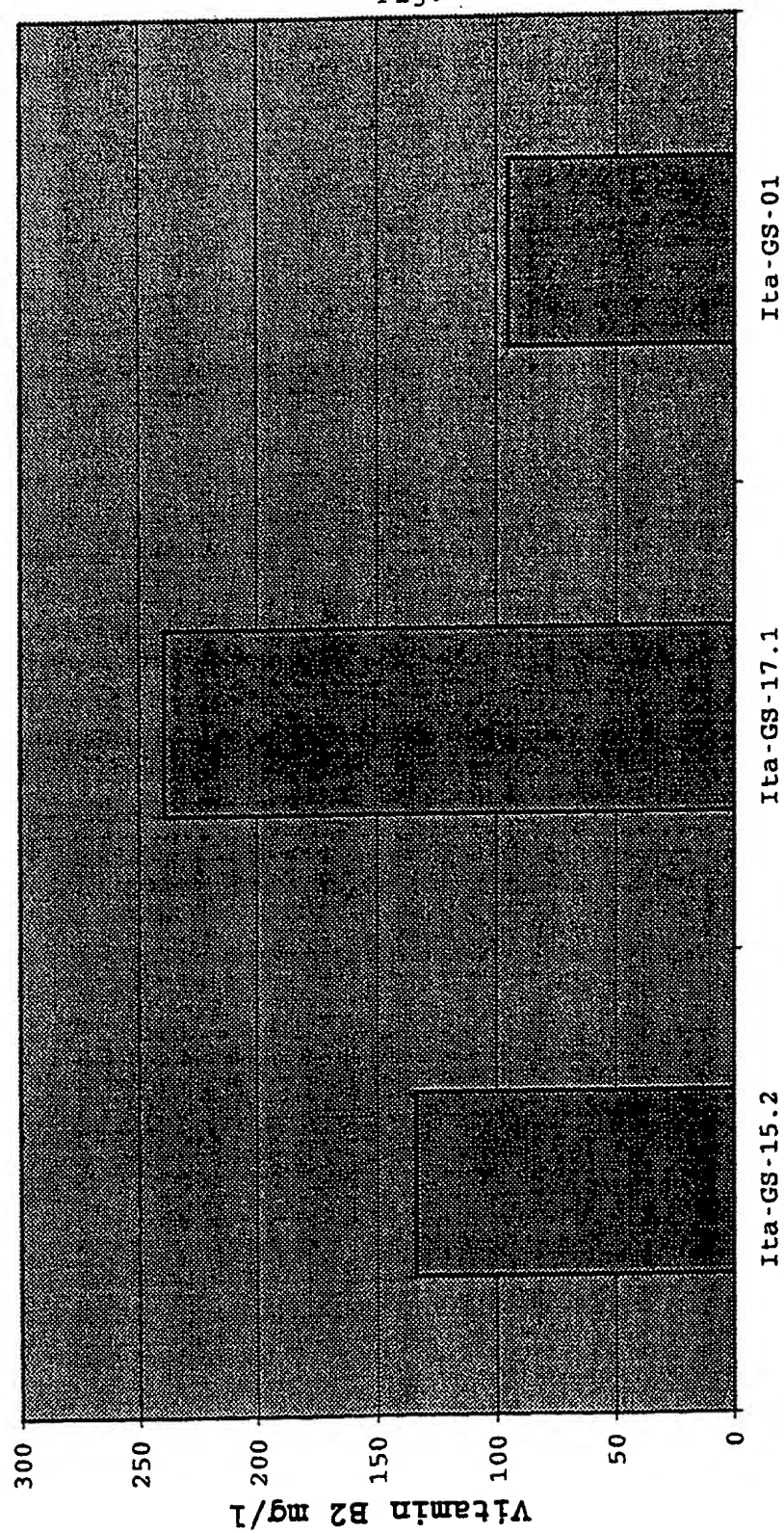


Fig. 2

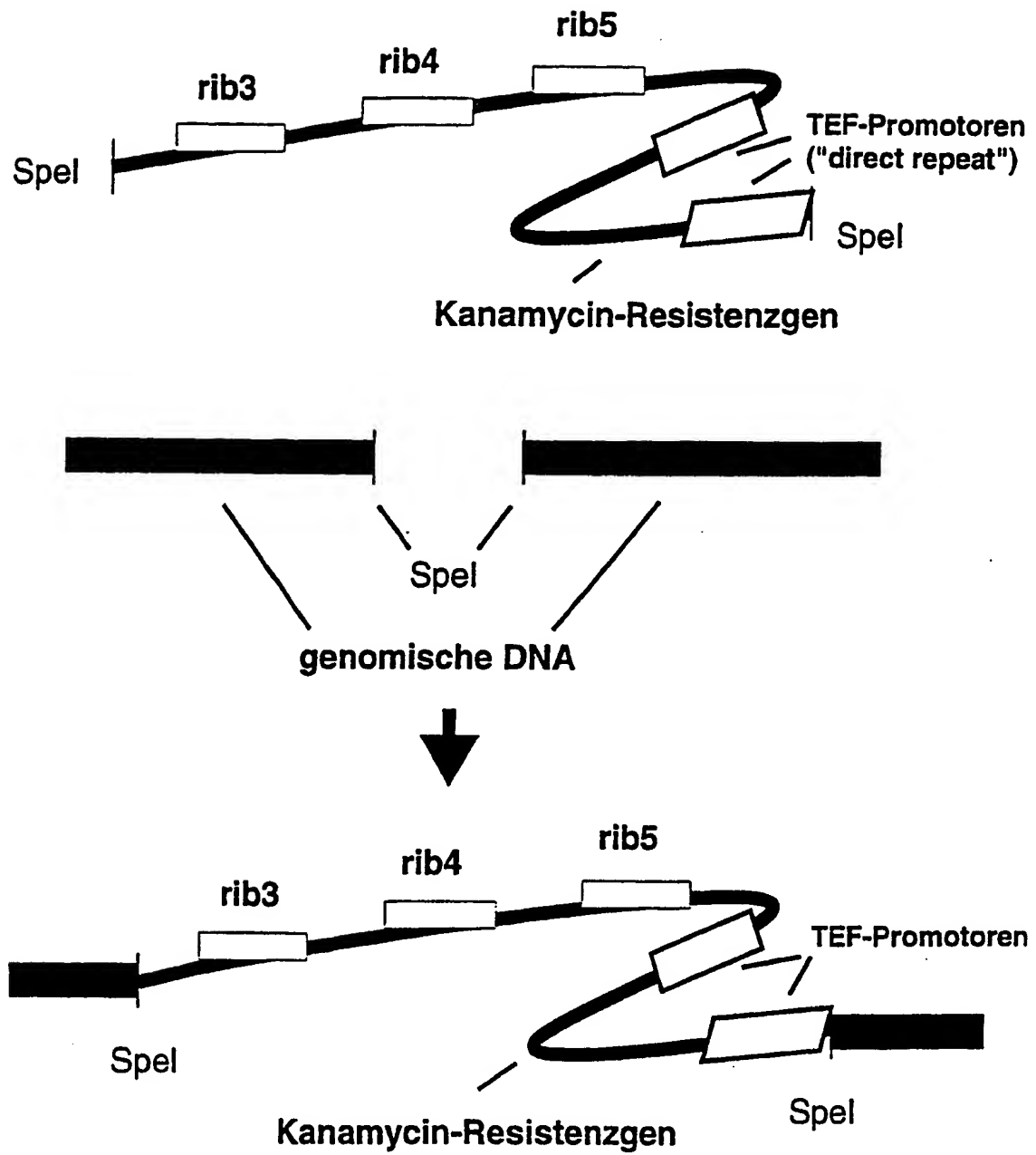


Fig. 3

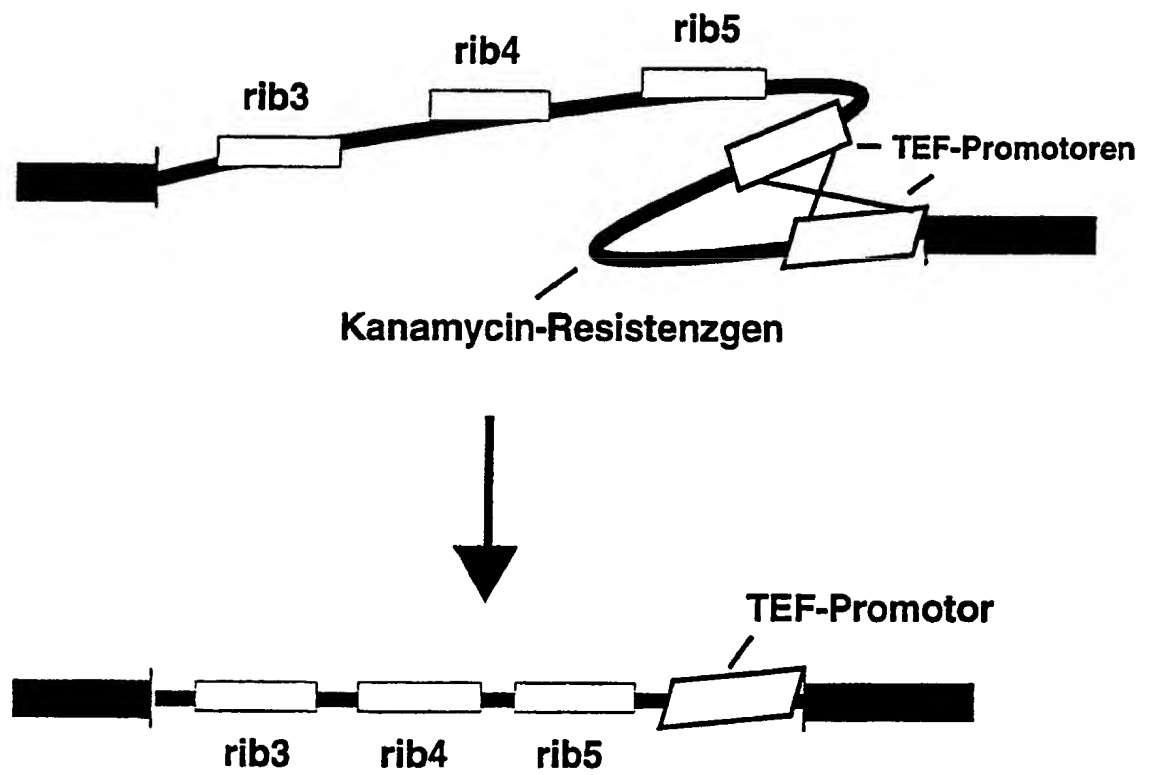
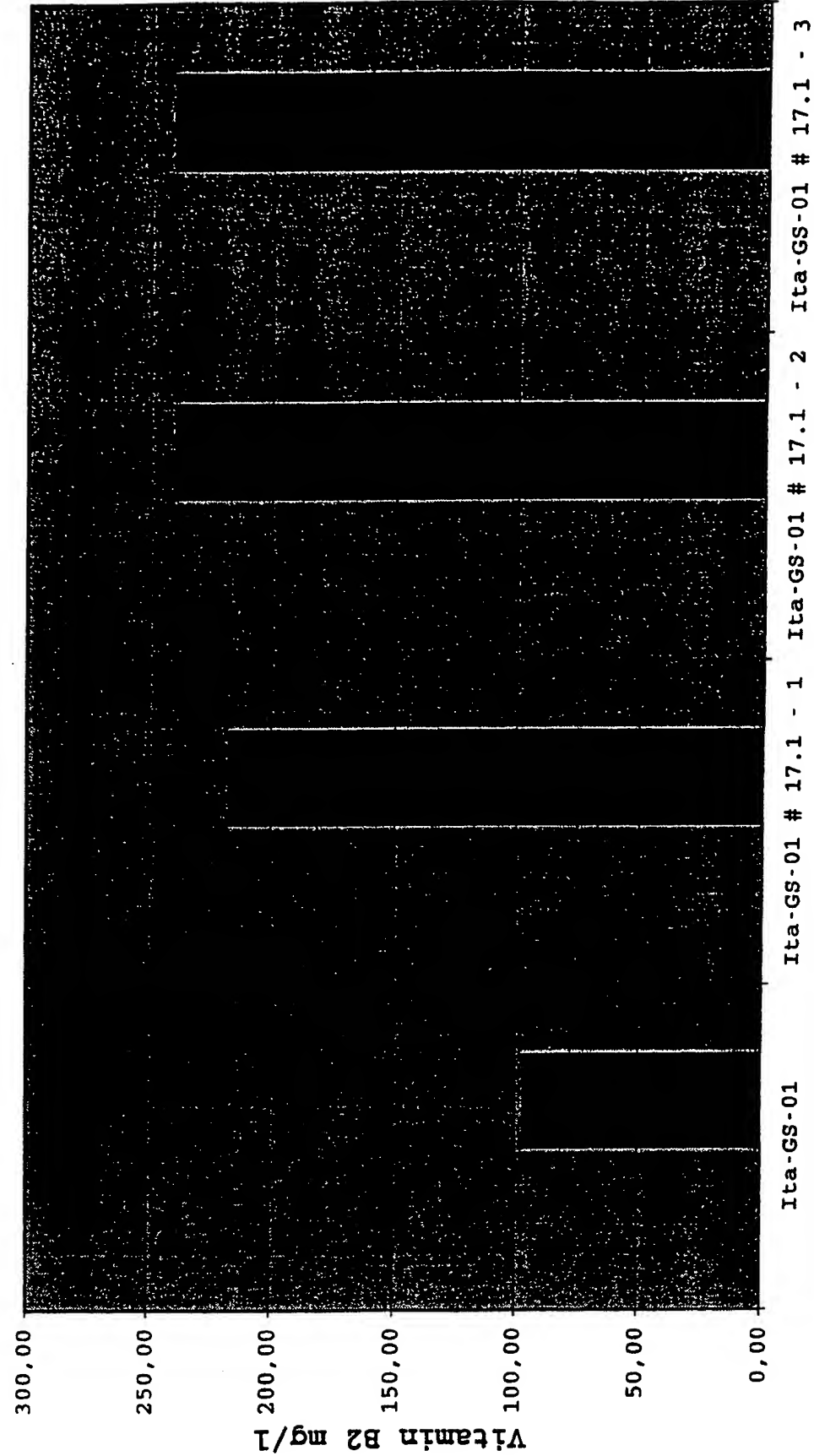


Fig. 4



## 1

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (D) BUNDESLAND: Rheinland-Pfalz
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056

(ii) ANMELDETITEL: Genetisches Verfahren zur Herstellung von Riboflavin

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 10

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 655 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Ashbya gossypii

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: ITA 17

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 11..649

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ACCAAGCAAC ATG ACA AGC CCA TGC ACT GAT ATC GGT ACC GCT ATA GAG	49
Met Thr Ser Pro Cys Thr Asp Ile Gly Thr Ala Ile Glu	
1 5 10	
CAG TTC AAG CAA AAT AAG ATG ATC ATC GTC ATG GAC CAC ATC TCG AGA	97
Gln Phe Lys Gln Asn Lys Met Ile Ile Val Met Asp His Ile Ser Arg	
15 20 25	
GAA AAC GAG GCC GAT CTA ATA TGT GCA GCA GCG CAC ATG ACT GCC GAG	145
Glu Asn Glu Ala Asp Leu Ile Cys Ala Ala Ala His Met Thr Ala Glu	
30 35 40 45	
CAA ATG GCA TTT ATG ATT CGG TAT TCC TCG GGC TAC GTT TGC GCT CCA	193
Gln Met Ala Phe Met Ile Arg Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Cys Ala Pro	
50 55 60	
ATG ACC AAT GCG ATT GCC GAT AAG CTA GAC CTA CCG CTC ATG AAC ACA	241
Met Thr Asn Ala Ile Ala Asp Lys Leu Asp Leu Pro Leu Met Asn Thr	
65 70 75	
TTG AAA TGC AAG GCT TTC TCC GAT GAC AGA CAC AGC ACT GCG TAT ACA	289
Leu Lys Cys Lys Ala Phe Ser Asp Asp Arg His Ser Thr Ala Tyr Thr	

## 2

80	85	90	
ATC ACC TGT GAC TAT GCG CAC GGG ACG ACG ACA GGT ATC TCC GCA CGT			337
Ile Thr Cys Asp Tyr Ala His Gly Thr Thr Thr Gly Ile Ser Ala Arg			
95	100	105	
GAC CGG GCG TTG ACC TGT AAT CAG TTG GCG AAC CCG GAG TCC AAG GCT			385
Asp Arg Ala Leu Thr Cys Asn Gln Leu Ala Asn Pro Glu Ser Lys Ala			
110	115	120	125
ACC GAC TTC ACG AAG CCA GGC CAC ATT GTG CCA TTG CGT GCC CGT GAC			433
Thr Asp Phe Thr Lys Pro Gly His Ile Val Pro Leu Arg Ala Arg Asp			
130	135	140	
GGC GGC GTG CTC GAG CGT GAC GGG CAC ACC GAA GCG GCG CTC GAC TTG			481
Gly Gly Val Leu Glu Arg Asp Gly His Thr Glu Ala Ala Leu Asp Leu			
145	150	155	
TGC AGA CTA GCG GGT GTG CCA GAG GTC GCT GCT ATT TGT GAA TTA GTA			529
Cys Arg Leu Ala Gly Val Pro Glu Val Ala Ala Ile Cys Glu Leu Val			
160	165	170	
AGC GAA AGG GAC GTC GGG CTG ATG ATG ACT TTG GAT GAG TGT ATA GAA			577
Ser Glu Arg Asp Val Gly Leu Met Met Thr Leu Asp Glu Cys Ile Glu			
175	180	185	
TTC AGC AAG AAG CAC GGT CTT GCC CTC ATC ACC GTC GAT GAC CTG AAG			625
Phe Ser Lys Lys His Gly Leu Ala Leu Ile Thr Val Asp Asp Leu Lys			
190	195	200	205
GCT GCA GTT GCC GCC AAG CAG TAGACGGCA			655
Ala Ala Val Ala Ala Lys Gln			
210			

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 212 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Thr Ser Pro Cys Thr Asp Ile Gly Thr Ala Ile Glu Gln Phe Lys			
1	5	10	15
Gln Asn Lys Met Ile Ile Val Met Asp His Ile Ser Arg Glu Asn Glu			
20	25	30	
Ala Asp Leu Ile Cys Ala Ala Ala His Met Thr Ala Glu Gln Met Ala			
35	40	45	
Phe Met Ile Arg Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Cys Ala Pro Met Thr Asn			
50	55	60	
Ala Ile Ala Asp Lys Leu Asp Leu Pro Leu Met Asn Thr Leu Lys Cys			
65	70	75	80
Lys Ala Phe Ser Asp Arg His Ser Thr Ala Tyr Thr Ile Thr Cys			
85	90	95	
Asp Tyr Ala His Gly Thr Thr Thr Gly Ile Ser Ala Arg Asp Arg Ala			
100	105	110	
Leu Thr Cys Asn Gln Leu Ala Asn Pro Glu Ser Lys Ala Thr Asp Phe			
115	120	125	
Thr Lys Pro Gly His Ile Val Pro Leu Arg Ala Arg Asp Gly Gly Val			
130	135	140	
Leu Glu Arg Asp Gly His Thr Glu Ala Ala Leu Asp Leu Cys Arg Leu			
145	150	155	160

## 3

Ala Gly Val Pro Glu Val Ala Ala Ile Cys Glu Leu Val Ser Glu Arg  
                                   165                                  170                                  175  
 Asp Val Gly Leu Met Met Thr Leu Asp Glu Cys Ile Glu Phe Ser Lys  
                                   180                                  185                                  190  
 Lys His Gly Leu Ala Leu Ile Thr Val Asp Asp Leu Lys Ala Ala Val  
                                   195                                  200                                  205  
 Ala Ala Lys Gln  
                                   210

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 529 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Ashbya gossypii

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: ITA 17

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LÄNGE: 8..526

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AGTGACA ATG ATT AAG GGA TTA GGC GAA GTT GAT CAA ACC TAC GAT GCG	49
Met Ile Lys Gly Leu Gly Glu Val Asp Gln Thr Tyr Asp Ala	
1                                  5                                  10	
AGC TCT GTC AAG GTT GGC ATT GTC CAC GCG AGA TGG AAC AAG ACT GTC	97
Ser Ser Val Lys Val Gly Ile Val His Ala Arg Trp Asn Lys Thr Val	
15                                  20                                  25                                  30	
ATT GAC GCT CTC GTC CAA GGT GCA ATT GAG AAA CTG CTT GCT ATG GGA	145
Ile Asp Ala Leu Val Gln Gly Ala Ile Glu Lys Leu Leu Ala Met Gly	
35                                  40                                  45	
GTG AAG GAG AAG AAT ATC ACT GTA AGC ACC GTT CCA GGT GCG TTT GAA	193
Val Lys Glu Lys Asn Ile Thr Val Ser Thr Val Pro Gly Ala Phe Glu	
50                                  55                                  60	
CTA CCA TTT GGC ACT CAG CGG TTT GCC GAG CTG ACC AAG GCA AGT GGC	241
Leu Pro Phe Gly Thr Gln Arg Phe Ala Glu Leu Thr Lys Ala Ser Gly	
65                                  70                                  75	
AAG CAT TTG GAC GTG GTC ATC CCA ATT GGA GTC CTG ATC AAA GGC GAC	289
Lys His Leu Asp Val Val Ile Pro Ile Gly Val Leu Ile Lys Gly Asp	
80                                  85                                  90	
TCA ATG CAC TTT GAA TAT ATA TCA GAC TCT GTG ACT CAT GCC TTA ATG	337
Ser Met His Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ser Val Thr His Ala Leu Met	
95                                  100                                  105                                  110	
AAC CTA CAG AAG AAG ATT CGT CTT CCT GTC ATT TTT GGT TTG CTA ACG	385
Asn Leu Gln Lys Lys Ile Arg Leu Pro Val Ile Phe Gly Leu Leu Thr	
115                                  120                                  125	
TGT CTA ACA GAG GAA CAA GCG TTG ACA CGT GCA GGC CTC GGT GAA TCT	433
Cys Leu Thr Glu Glu Gln Ala Leu Thr Arg Ala Gly Leu Gly Glu Ser	
130                                  135                                  140	

.4

GAA GGC AAG CAC AAC CAC GGT GAA GAC TGG GGT GCT GCT GCC GTG GAG 481  
 Glu Gly Lys His Asn His Gly Glu Asp Trp Gly Ala Ala Ala Val Glu  
 145 150 155  
 ATG GCT GTA AAG TTT GGC CCA CGC GCC GAA CAA ATG AAG AAG TGAATA 529  
 Met Ala Val Lys Phe Gly Pro Arg Ala Glu Gln Met Lys Lys  
 160 165 170

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 172 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Ile Lys Gly Leu Gly Glu Val Asp Gln Thr Tyr Asp Ala Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Val Lys Val Gly Ile Val His Ala Arg Trp Asn Lys Thr Val Ile Asp  
 20 25 30  
 Ala Leu Val Gln Gly Ala Ile Glu Lys Leu Leu Ala Met Gly Val Lys  
 35 40 45  
 Glu Lys Asn Ile Thr Val Ser Thr Val Pro Gly Ala Phe Glu Leu Pro  
 50 55 60  
 Phe Gly Thr Gln Arg Phe Ala Glu Leu Thr Lys Ala Ser Gly Lys His  
 65 70 75 80  
 Leu Asp Val Val Ile Pro Ile Gly Val Leu Ile Lys Gly Asp Ser Met  
 85 90 95  
 His Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ser Val Thr His Ala Leu Met Asn Leu  
 100 105 110  
 Gln Lys Lys Ile Arg Leu Pro Val Ile Phe Gly Leu Leu Thr Cys Leu  
 115 120 125  
 Thr Glu Glu Gln Ala Leu Thr Arg Ala Gly Leu Gly Glu Ser Glu Gly  
 130 135 140  
 Lys His Asn His Gly Glu Asp Trp Gly Ala Ala Ala Val Glu Met Ala  
 145 150 155 160  
 Val Lys Phe Gly Pro Arg Ala Glu Gln Met Lys Lys  
 165 170

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 712 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Ashbya gossypii

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: ITA 17

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 5..712

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:



## 5

TAGG ATG TTT ACC GGT ATA GTG GAA CAC ATT GGC ACT GTT GCT GAG TAC	49
Met Phe Thr Gly Ile Val Glu His Ile Gly Thr Val Ala Glu Tyr	
1 5 10 15	
TTG GAG AAC GAT GCC AGC GAG GCA GGC GGC AAC GGT GTG TCA GTC CTT	97
Leu Glu Asn Asp Ala Ser Glu Ala Gly Gly Asn Gly Val Ser Val Leu	
20 25 30	
ATC AAG GAT GCG GCT CCG ATA CTG GCG GAT TGC CAC ATC GGT GAC TCG	145
Ile Lys Asp Ala Ala Pro Ile Leu Ala Asp Cys His Ile Gly Asp Ser	
35 40 45	
ATT GCA TGC AAT GGT ATC TGC CTG ACG GTG ACG GAG TTC ACG GCC GAT	193
Ile Ala Cys Asn Gly Ile Cys Leu Thr Val Thr Glu Phe Thr Ala Asp	
50 55 60	
AGC TTC AAG GTC GGG ATC GCA CCA GAA ACA GTT TAT CGG ACG GAA GTC	241
Ser Phe Lys Val Gly Ile Ala Pro Glu Thr Val Tyr Arg Thr Glu Val	
65 70 75	
AGC AGC TGG AAA GCT GGC TCC AAG ATC AAC CTA GAA AGG GCC ATC TCG	289
Ser Ser Trp Lys Ala Gly Ser Lys Ile Asn Leu Glu Arg Ala Ile Ser	
80 85 90 95	
GAC GAC AGG CGC TAC GGC GGC CAC TAC GTG CAG GGC CAC GTC GAC TCG	337
Asp Asp Arg Arg Tyr Gly Gly His Tyr Val Gln Gly His Val Asp Ser	
100 105 110	
GTG GCC TCT ATT GTA TCC AGA GAG CAC GAC GGC AAC TCT ATC AAC TTT	385
Val Ala Ser Ile Val Ser Arg Glu His Asp Gly Asn Ser Ile Asn Phe	
115 120 125	
AAG TTT AAA CTG CGC GAT CAA GAG TAC GAG AAG TAC GTA GTA GAA AAG	433
Lys Phe Lys Leu Arg Asp Gln Glu Tyr Glu Lys Tyr Val Val Glu Lys	
130 135 140	
GGT TTT GTG GCG ATC GAC GGT GTG TCG CTG ACT GTA AGC AAG ATG GAT	481
Gly Phe Val Ala Ile Asp Gly Val Ser Leu Thr Val Ser Lys Met Asp	
145 150 155	
CCA GAT GGC TGT TTC TAC ATC TCG ATG ATT GCA CAC ACG CAG ACC GCT	529
Pro Asp Gly Cys Phe Tyr Ile Ser Met Ile Ala His Thr Gln Thr Ala	
160 165 170 175	
GTA GCC CTT CCA CTG AAG CCG GAC GGT GCC CTC GTG AAC ATA GAA ACG	577
Val Ala Leu Pro Leu Lys Pro Asp Gly Ala Leu Val Asn Ile Glu Thr	
180 185 190	
GAT GTT AAC GGC AAG CTA GTA GAG AAG CAG GTT GCA CAG TAC CTG AAT	625
Asp Val Asn Gly Lys Leu Val Glu Lys Gln Val Ala Gln Tyr Leu Asn	
195 200 205	
GCG CAG CTG GAA GGT GAG AGC TCG CCA TTG CAG CGC GTG CTC GAA AGG	673
Ala Gln Leu Glu Gly Glu Ser Ser Pro Leu Gln Arg Val Leu Glu Arg	
210 215 220	
ATT ATT GAA TCC AAG CTT GCT AGC ATC TCA AAT AAG TG	712
Ile Ile Glu Ser Lys Leu Ala Ser Ile Ser Asn Lys	
225 230 235	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 235 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

## 6

```

Met Phe Thr Gly Ile Val Glu His Ile Gly Thr Val Ala Glu Tyr Leu
  1           5           10           15
Glu Asn Asp Ala Ser Glu Ala Gly Gly Asn Gly Val Ser Val Leu Ile
      20           25           30
Lys Asp Ala Ala Pro Ile Leu Ala Asp Cys His Ile Gly Asp Ser Ile
      35           40           45
Ala Cys Asn Gly Ile Cys Leu Thr Val Thr Glu Phe Thr Ala Asp Ser
      50           55           60
Phe Lys Val Gly Ile Ala Pro Glu Thr Val Tyr Arg Thr Glu Val Ser
      65           70           75           80
Ser Trp Lys Ala Gly Ser Lys Ile Asn Leu Glu Arg Ala Ile Ser Asp
      85           90           95
Asp Arg Arg Tyr Gly Gly His Tyr Val Gln Gly His Val Asp Ser Val
      100          105          110
Ala Ser Ile Val Ser Arg Glu His Asp Gly Asn Ser Ile Asn Phe Lys
      115          120          125
Phe Lys Leu Arg Asp Gln Glu Tyr Glu Lys Tyr Val Val Glu Lys Gly
      130          135          140
Phe Val Ala Ile Asp Gly Val Ser Leu Thr Val Ser Lys Met Asp Pro
      145          150          155          160
Asp Gly Cys Phe Tyr Ile Ser Met Ile Ala His Thr Gln Thr Ala Val
      165          170          175
Ala Leu Pro Leu Lys Pro Asp Gly Ala Leu Val Asn Ile Glu Thr Asp
      180          185          190
Val Asn Gly Lys Leu Val Glu Lys Gln Val Ala Gln Tyr Leu Asn Ala
      195          200          205
Gln Leu Glu Gly Glu Ser Ser Pro Leu Gln Arg Val Leu Glu Arg Ile
      210          215          220
Ile Glu Ser Lys Leu Ala Ser Ile Ser Asn Lys
      225          230          235

```

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 6317 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Ashbya gossypii

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: 5

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 2306..2944

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 3575..4282

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 4717..5235

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

ACTAGTGGAT	CCCCCGGGCT	GCAGGAATTC	GATATCAAGC	TTGTCTCAAA	ATCTCTGATG	60										
TTACATTGCA	CAAGATAAAA	ATATATCATC	ATGAACAATA	AAACTGTCTG	CTTACATAAA	120										
CAGTAATACA	AGGGGTGTTA	TGAGCCATAT	TCAACGGGAA	ACGTCTTGCT	CGAAGCTTGC	180										
CTCGTCCCGC	CGGGTCACCC	GGCCAGCGAC	ATGGAGGCCC	AGAATACCCT	CCTTGACAGT	240										
CTTGACGTGC	GCAGCTCAGG	GGCATGATGT	GACTGTGCGC	CGTACATTTA	GCCCATACAT	300										
CCCCATGTAT	AATCATTTGC	ATCCATACAT	TTTGATGGCC	GCACGGCGCG	AACGAAAAAT	360										
TACGGCTCCT	CGCTGCAGAC	CTGCGAGCAG	GGAAACGCTC	CCCTCACAGA	CGCGTTGAAT	420										
TCTCCCCACG	GCGCGCCCCT	GTAGAGAAAT	ATAAAAGGTT	AGGATTTGCC	ACTGAGGTTT	480										
TTCTTTTCATA	TACTTCCTTT	TAAAATCTTG	CTAGGATACA	GTTCTCACAT	CACATCCGAA	540										
CATAAACAAA	AATGGGTAAG	GAAAAGACTC	ACGTTTCGAG	GCCGCGATTA	AATTCCAACA	600										
TGGATGCTGA	TTTATATGGG	TATAAATGGG	CTCGCGATAA	TGTCGGGCAA	TCAGGTGCGA	660										
CAATCTATCG	ATTGTATGGG	AAGCCCGATG	CGCCAGAGTT	GTTTCTGAAA	CATGGCAAAG	720										
GTAGCGTTGC	CAATGATGTT	ACAGATGAGA	TGGTCAGACT	AAACTGGCTG	ACGGAATTTA	780										
TGCCTCTTCC	GACCATCAAG	CATTTTATCC	GTACTCCTGA	TGATGCATGG	TTACTCACCA	840										
CTGCGATCCC	CGGGAAAACA	GCATTCCAGG	TATTAGAAGA	ATATCCTGAT	TCAGGTGAAA	900										
ATATTGTTGA	TGCGCTGGCA	GTGTTCCCTG	GCCGGTTGCA	TTCGATTCCCT	GTTTGTAATT	960										
GTCCTTTTAA	CAGCGATCGC	GTATTTTCGTC	TCGCTCAGGC	GCAATCACGA	ATGAATAACG	1020										
GTTTGTTTGA	TGCGAGTGAT	TTTGATGACG	AGCGTAATGG	CTGGCCTGTT	GAACAAGTCT	1080										
GGAAAGAAAT	GCATAAGCTT	TTGCCATTCT	CACCGGATTC	AGTCGTCACT	CATGGTGATT	1140										
TCTCACTTGA	TAACCTTATT	TTTGACGAGG	GGAAATTAAT	AGGTTGTATT	GATGTTGGAC	1200										
GAGTCGGAAT	CGCAGACCGA	TACCAGGATC	TTGCCATCCT	ATGGAAGTGC	CTCGGTGAGT	1260										
TTTCTCCTTC	ATTACAGAAA	CGGCTTTTTT	AAAAATATGG	TATTGATAAT	CCTGATATGA	1320										
ATAAATTGCA	GTTTCATTTG	ATGCTCGATG	AGTTTTTCTA	ATCAGAATTG	GTTAATTGGT	1380										
TGTAACACTG	GCAGAGCATT	ACGCTGACTT	GACGGGACGG	CGGCTTTGTT	GAATAAATCG	1440										
AACTTTTGCT	GAGTTGAAGG	ATCAGATCAC	GCATCTTCCC	GACAACGCAG	ACCGTTCCGT	1500										
GGCAAAGCAA	AAGTTCAAAA	TCACCAACTG	GTCCACCTAC	AACAAAGCTC	TCATCAACCG	1560										
TGGCTCCCTC	ACTTTCTGGC	TGGATGATGG	GGCGATTGAG	GCCTGGTATG	AGTCAGCAAC	1620										
ACCTTCTTCA	CGAGGCAGAC	CTCAGCGCTA	TTCTGACCTT	GCCATCACGA	CTGTGCTGGT	1680										
CATTAAACGC	GTATTCAGGC	TGACCCTGCG	CGCTGCGCAG	GGCTTTATTG	ATTCCATTTT	1740										
TACACTGATG	AATGTTCCGT	TGCGCTGCCC	GGATTACAGC	TGTAATTGAC	AAGCCAGACA	1800										
GAACAAAGGG	ACTTGGCACT	TGTAACAGAA	ATTCCAAGTA	AATAAGGGGA	GTTATTCAAG	1860										
AACGCCATTG	CTACATTGGG	TCACGATGTT	CGAGCCGGAA	TTCGCATTAT	CCATTGAACA	1920										
CAGCCGCCAA	CATAACCGGA	AAACTCACAC	TTGATTGCAA	AGGAACAGCA	CATCCCAAGT	1980										
CACTAGAAGA	TCCCTTCTTG	CACGGTCGTT	TCTGAAACTC	TACGATTAAT	GGAACAATGA	2040										
GTAAGTCCTC	AAATGTACCA	CCTATCTGTA	GTTTACTATC	GGATTTACTG	GCTAAGAGCT	2100										
GACCTGTTAG	GCAAGTGAAA	CATATCACAT	CGCCAGCAGG	TTGGGCTACC	AAGGATAGTT	2160										
GATGACTTCC	ATCACCTATA	AAAGCGGCTT	GAGTGCTTTT	GCAATGATTC	TGTTACATG	2220										
ATGGACAAGA	AATACGTACA	AAAATTTCAA	CGTTTACAA	GTTCCCAAGC	TTAGTCAACT	2280										
CATCACCAAC	GACAAACCAA	GCAAC	ATG	ACA	AGC	CCA	TGC	ACT	GAT	ATC	GGT	2332				
Met Thr Ser Pro Cys Thr Asp Ile Gly																
1						5										
ACC	GCT	ATA	GAG	CAG	TTC	AAG	CAA	AAT	AAG	ATG	ATC	ATC	GTC	ATG	GAC	2380
Thr	Ala	Ile	Glu	Gln	Phe	Lys	Gln	Asn	Lys	Met	Ile	Ile	Val	Met	Asp	
10	15					20					25					
CAC	ATC	TCG	AGA	GAA	AAC	GAG	GCC	GAT	CTA	ATA	TGT	GCA	GCA	GCG	CAC	2428
His	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Glu	Ala	Asp	Leu	Ile	Cys	Ala	Ala	Ala	His	
30				35				40								
ATG	ACT	GCC	GAG	CAA	ATG	GCA	TTT	ATG	ATT	CGG	TAT	TCC	TCG	GGC	TAC	2476
Met	Thr	Ala	Glu	Gln	Met	Ala	Phe	Met	Ile	Arg	Tyr	Ser	Ser	Gly	Tyr	
45				50				55								
GTT	TGC	GCT	CCA	ATG	ACC	AAT	GCG	ATT	GCC	GAT	AAG	CTA	GAC	CTA	CCG	2524

Val	Cys	Ala	Pro	Met	Thr	Asn	Ala	Ile	Ala	Asp	Lys	Leu	Asp	Leu	Pro						
		60					65					70									
CTC	ATG	AAC	ACA	TTG	AAA	TGC	AAG	GCT	TTC	TCC	GAT	GAC	AGA	CAC	AGC	2572					
Leu	Met	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	Lys	Ala	Phe	Ser	Asp	Asp	Arg	His	Ser						
		75				80					85										
ACT	GCG	TAT	ACA	ATC	ACC	TGT	GAC	TAT	GCG	CAC	GGG	ACG	ACG	ACA	GGT	2620					
Thr	Ala	Tyr	Thr	Ile	Thr	Cys	Asp	Tyr	Ala	His	Gly	Thr	Thr	Thr	Gly						
		90				95				100					105						
ATC	TCC	GCA	CGT	GAC	CGG	GCG	TTG	ACC	TGT	AAT	CAG	TTG	GCG	AAC	CCG	2668					
Ile	Ser	Ala	Arg	Asp	Arg	Ala	Leu	Thr	Cys	Asn	Gln	Leu	Ala	Asn	Pro						
				110					115					120							
GAG	TCC	AAG	GCT	ACC	GAC	TTC	ACG	AAG	CCA	GGC	CAC	ATT	GTG	CCA	TTG	2716					
Glu	Ser	Lys	Ala	Thr	Asp	Phe	Thr	Lys	Pro	Gly	His	Ile	Val	Pro	Leu						
			125					130				135									
CGT	GCC	CGT	GAC	GGC	GGC	GTG	CTC	GAG	CGT	GAC	GGG	CAC	ACC	GAA	GCG	2764					
Arg	Ala	Arg	Asp	Gly	Gly	Val	Leu	Glu	Arg	Asp	Gly	His	Thr	Glu	Ala						
			140				145				150										
GCG	CTC	GAC	TTG	TGC	AGA	CTA	GCG	GGT	GTG	CCA	GAG	GTC	GCT	GCT	ATT	2812					
Ala	Leu	Asp	Leu	Cys	Arg	Leu	Ala	Gly	Val	Pro	Glu	Val	Ala	Ala	Ile						
			155			160				165											
TGT	GAA	TTA	GTA	AGC	GAA	AGG	GAC	GTG	GGG	CTG	ATG	ATG	ACT	TTG	GAT	2860					
Cys	Glu	Leu	Val	Ser	Glu	Arg	Asp	Val	Gly	Leu	Met	Met	Thr	Leu	Asp						
					175					180					185						
GAG	TGT	ATA	GAA	TTC	AGC	AAG	AAG	CAC	GGT	CTT	GCC	CTC	ATC	ACC	GTC	2908					
Glu	Cys	Ile	Glu	Phe	Ser	Lys	Lys	His	Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	Thr	Val						
				190					195				200								
GAT	GAC	CTG	AAG	GCT	GCA	GTT	GCC	GCC	AAG	CAG	TAGACGGCAA				CGAGTTCTTT	2961					
Asp	Asp	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Lys	Gln											
			205				210														
AAGTCGGTGT TCATTTATGT AATATAACCAT TTCGTCGAAA AAGTCAAATG GTATGAACTA																3021					
GATTTATCAA TAGTATCTAA GAGTTATGGT ATTCGCAAAA GCTTATCGAT ACCGTCGACA																3081					
TGGCGCGGGC GAATACCAAC CCACAGGAGC CAGATATAAG ACCAATCCCG GCGGGTGTGC																3141					
CAGCCGCCAT CAGAGACAGC GGGCCAGCAA GGCATGTGAA GTCAAAAGGC GCCAGCTCCT																3201					
TATCCGCTCC CGCACAAGCA GGACCGGCAT ATCCCGATGA GCGCGCCAGC ACCCAGACGC																3261					
TACACCACCA TTCGAAGTAG ACTTTAAAAG AGCGCTTTCC AGCTTCTCAG GCAGTTAGCT																3321					
CTACGACAAA GGAACCAAGT GATTTTCCCG ATAGACGCGA CTTGCTCAAC GATGTTTCTG																3381					
TGACCAGCGC AAGGAGAGAT AGTCCTAAAG TATAATCAGA TAGTTAGTCG TATCTTCTAG																3441					
TTTTATTAGT CAGCTACATG GCGAACCGCC ATTCCTTAT GCATGTCTTA CGAGTTTAAA																3501					
AAGCTCGCGG TAGCAGAAAA GAAGATGCAT AGATGGCATA CCGAAGCCTA TATCGCCCAT																3561					
AGAAGTTGAT AGG ATG TTT ACC GGT ATA GTG GAA CAC ATT GGC ACT GTT																3610					
			Met	Phe	Thr	Gly	Ile	Val	Glu	His	Ile	Gly	Thr	Val							
			1				5					10									
GCT	GAG	TAC	TTG	GAG	AAC	GAT	GCC	AGC	GAG	GCA	GGC	GGC	AAC	GGT	GTG	3658					
Ala	Glu	Tyr	Leu	Glu	Asn	Asp	Ala	Ser	Glu	Ala	Gly	Gly	Asn	Gly	Val						
			15				20					25									
TCA	GTC	CTT	ATC	AAG	GAT	GCG	GCT	CCG	ATA	CTG	GCG	GAT	TGC	CAC	ATC	3706					
Ser	Val	Leu	Ile	Lys	Asp	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ala	Asp	Cys	His	Ile						
			30				35					40									
GGT	GAC	TCG	ATT	GCA	TGC	AAT	GGT	ATC	TGC	CTG	ACG	GTG	ACG	GAG	TTC	3754					
Gly	Asp	Ser	Ile	Ala	Cys	Asn	Gly	Ile	Cys	Leu	Thr	Val	Thr	Glu	Phe						
			45			50				55				60							
ACG	GCC	GAT	AGC	TTC	AAG	GTC	GGG	ATC	GCA	CCA	GAA	ACA	GTT	TAT	CGG	3802					

Thr	Ala	Asp	Ser	Phe	Lys	Val	Gly	Ile	Ala	Pro	Glu	Thr	Val	Tyr	Arg	
				65				70						75		
ACG	GAA	GTC	AGC	AGC	TGG	AAA	GCT	GGC	TCC	AAG	ATC	AAC	CTA	GAA	AGG	3850
Thr	Glu	Val	Ser	Ser	Trp	Lys	Ala	Gly	Ser	Lys	Ile	Asn	Leu	Glu	Arg	
			80					85					90			
GCC	ATC	TCG	GAC	GAC	AGG	CGC	TAC	GGC	GGG	CAC	TAC	GTG	CAG	GGC	CAC	3898
Ala	Ile	Ser	Asp	Asp	Arg	Arg	Tyr	Gly	Gly	His	Tyr	Val	Gln	Gly	His	
			95				100					105				
GTC	GAC	TCG	GTG	GCC	TCT	ATT	GTA	TCC	AGA	GAG	CAC	GAC	GGG	AAC	TCT	3946
Val	Asp	Ser	Val	Ala	Ser	Ile	Val	Ser	Arg	Glu	His	Asp	Gly	Asn	Ser	
			110			115						120				
ATC	AAC	TTT	AAG	TTT	AAA	CTG	CGC	GAT	CAA	GAG	TAC	GAG	AAG	TAC	GTA	3994
Ile	Asn	Phe	Lys	Phe	Lys	Leu	Arg	Asp	Gln	Glu	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Val	
			125			130			135					140		
GTA	GAA	AAG	GGT	TTT	GTG	GCG	ATC	GAC	GGT	GTG	TCG	CTG	ACT	GTA	AGC	4042
Val	Glu	Lys	Gly	Phe	Val	Ala	Ile	Asp	Gly	Val	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	
				145				150					155			
AAG	ATG	GAT	CCA	GAT	GGC	TGT	TTC	TAC	ATC	TCG	ATG	ATT	GCA	CAC	ACG	4090
Lys	Met	Asp	Pro	Asp	Gly	Cys	Phe	Tyr	Ile	Ser	Met	Ile	Ala	His	Thr	
			160					165					170			
CAG	ACC	GCT	GTA	GCC	CTT	CCA	CTG	AAG	CCG	GAC	GGT	GCC	CTC	GTG	AAC	4138
Gln	Thr	Ala	Val	Ala	Leu	Pro	Leu	Lys	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Val	Asn	
			175			180						185				
ATA	GAA	ACG	GAT	GTT	AAC	GGC	AAG	CTA	GTA	GAG	AAG	CAG	GTT	GCA	CAG	4186
Ile	Glu	Thr	Asp	Val	Asn	Gly	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Gln	Val	Ala	Gln	
			190			195						200				
TAC	CTG	AAT	GCG	CAG	CTG	GAA	GGT	GAG	AGC	TCG	CCA	TTG	CAG	CGC	GTG	4234
Tyr	Leu	Asn	Ala	Gln	Leu	Glu	Gly	Glu	Ser	Ser	Pro	Leu	Gln	Arg	Val	
			205			210				215				220		
CTC	GAA	AGG	ATT	ATT	GAA	TCC	AAG	CTT	GCT	AGC	ATC	TCA	AAT	AAG	TGATTAGAAG	4289
Leu	Glu	Arg	Ile	Ile	Glu	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Ile	Ser	Asn	Lys		
			225					230					235			
GACAAGCTGC	AAGATAAGAA	GGCCCCCGTT	AACTTAGTGT	AGGCAACCTT	AGCCTTAGAT											4349
TATCCGCTAA	CGTCATTCTG	TATTTTACTC	ATATTATATG	TAATATAGGG	GGGTTATCCG											4409
AGATACTAGA	CTACTAGCGT	ACTAGAGGAT	TATACATGGT	ATAATGATAC	AGGAAGTGAA											4469
AATCCGAAAG	GTTCAGACGA	TGAAAAGAGT	TTGAGACGCA	TCAATGATCA	GCTTTGAGCT											4529
ATATGTAAGT	CTATTAATTG	ATTACTAATA	GCAATTTATG	GTATCCTCTG	TTCTGCATAT											4589
CGACGGTTAC	TCACGTGATG	ATCAGCTTGA	GGCTTCGCGG	ATAAAGTTCC	ATCGATTACT											4649
ATAAAACCAT	CACATTAAAC	GTTCACTATA	GGCATAACACA	CAGACTAAGT	TCAAGTTAGC											4709
AGTGACA	ATG	ATT	AAG	GGA	TTA	GGC	GAA	GTT	GAT	CAA	ACC	TAC	GAT	GCG		4758
	Met	Ile	Lys	Gly	Leu	Gly	Glu	Val	Asp	Gln	Thr	Tyr	Asp	Ala		
	1				5					10						
AGC	TCT	GTC	AAG	GTT	GGC	ATT	GTC	CAC	GCG	AGA	TGG	AAC	AAG	ACT	GTC	4806
Ser	Ser	Val	Lys	Val	Gly	Ile	Val	His	Ala	Arg	Trp	Asn	Lys	Thr	Val	
	15				20					25				30		
ATT	GAC	GCT	CTC	GTC	CAA	GGT	GCA	ATT	GAG	AAA	CTG	CTT	GCT	ATG	GGA	4854
Ile	Asp	Ala	Leu	Val	Gln	Gly	Ala	Ile	Glu	Lys	Leu	Leu	Ala	Met	Gly	
			35			40							45			
GTG	AAG	GAG	AAG	AAT	ATC	ACT	GTA	AGC	ACC	GTT	CCA	GGT	GCG	TTT	GAA	4902
Val	Lys	Glu	Lys	Asn	Ile	Thr	Val	Ser	Thr	Val	Pro	Gly	Ala	Phe	Glu	
			50			55							60			
CTA	CCA	TTT	GGC	ACT	CAG	CGG	TTT	GCC	GAG	CTG	ACC	AAG	GCA	AGT	GGC	4950

10

Leu Pro Phe Gly Thr Gln Arg Phe Ala Glu Leu Thr Lys Ala Ser Gly  
65 70 75  
AAG CAT TTG GAC GTG GTC ATC CCA ATT GGA GTC CTG ATC AAA GGC GAC 4998  
Lys His Leu Asp Val Val Ile Pro Ile Gly Val Leu Ile Lys Gly Asp  
80 85 90  
TCA ATG CAC TTT GAA TAT ATA TCA GAC TCT GTG ACT CAT GCC TTA ATG 5046  
Ser Met His Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ser Val Thr His Ala Leu Met  
95 100 105 110  
AAC CTA CAG AAG AAG ATT CGT CTT CCT GTC ATT TTT GGT TTG CTA ACG 5094  
Asn Leu Gln Lys Lys Ile Arg Leu Pro Val Ile Phe Gly Leu Leu Thr  
115 120 125  
TGT CTA ACA GAG GAA CAA GCG TTG ACA CGT GCA GGC CTC GGT GAA TCT 5142  
Cys Leu Thr Glu Glu Gln Ala Leu Thr Arg Ala Gly Leu Gly Glu Ser  
130 135 140  
GAA GGC AAG CAC AAC CAC GGT GAA GAC TGG GGT GCT GCT GCC GTG GAG 5190  
Glu Gly Lys His Asn His Gly Glu Asp Trp Gly Ala Ala Ala Val Glu  
145 150 155  
ATG GCT GTA AAG TTT GGC CCA CGC GCC GAA CAA ATG AAG AAG TGAATATTAA 5242  
Met Ala Val Lys Phe Gly Pro Arg Ala Glu Gln Met Lys Lys  
160 165 170  
AAAATCACTA CTTAAATTA ACGTTTTTAT TATGTCTATA TCAAATTCTT ACGTGATAAC 5302  
TTTTGATTTT GCTTCCCTGGA TTGGCGCAAG GCCTCCCTGT GTCGCAGTTT TTGTTACGG 5362  
GTCCACACAG CTCTGTTTTT CCAGAACATA TCCTCCAGC TAGCATCTCA AATAAGTGAT 5422  
TATATTATCT TGGGTGCTGT ATATGTTATG TATGTCTTAC GACTGTGAAT CAGAGGGGTG 5482  
GCAGCTGGAA CACCAGCGAC ACACCTTCGT CTCCCGCGGT GATCAGCCTT CTGTTTTCTT 5542  
CAAGTAGTAC AAAGTCTAGG ACACCATGT TGTGGCCAAC GCAAACATGG AGCTGCTGCC 5602  
CGTTACGCAC GTCGAACCTG TAGACCTTGC CGTCAATGCA CGAGGCGAAC AGGTGGAAAC 5662  
CGGTGGTCTT GTCAAACGCC AGCTTCGTGA CCGAGTCCGG CAGCACGAAC TTGTGTCTGA 5722  
CCTTCAACGT CACAGTGTG TACAGCAGAA TGTCGCCCCG AACCAGGCCC ACGACCATGA 5782  
AGTTCATCCG AGACGAGAAT GCAATTGACT CTATCGAGGC GTCCATCTCC TCCTGGTCTT 5842  
CCTTGAGTTC GATCGTCTGC GTCAGGTGCG AACTGCAACC CTGCGCCGCG TTGATCACCG 5902  
CCAGCAGCCC GCTGTTTCGAG CCGCACGCCA CGATGGGCGA ACCGCGGTTG ATCCCCAGCG 5962  
GGAGCGTGCT CAACGTTATC CACTGCGCCT CCTGGCCCTT GAGTTCAGAC GGCGTCACCT 6022  
TGAATACCTG TTGCCCCTG TAGCAGTTCC AGCCAATTAT GGTCCCATCG AGGGAGCACG 6082  
TCACCACTAT GACGTTTTTC TCGTCTGCCG CAGTCTCCAG GAACACACCC ATCGTACAGT 6142  
CCTGGGCGTG GGCCACCCCC GTCATCAGCA GCACAGGCGT GTTGTCTGCT GTGTCCATCT 6202  
CGTAGCACCA CACCGACCCG TCCACAGCGC CAATCGCAA AATCCCAGCT CTGTGCGGGT 6262  
GCACCTTCAG CCAGGTCACC TCGTCCACCT CCTGCAGCCC GGGGGATCCA CTAGT 6317

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 212 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Thr Ser Pro Cys Thr Asp Ile Gly Thr Ala Ile Glu Gln Phe Lys  
1 5 10 15  
Gln Asn Lys Met Ile Ile Val Met Asp His Ile Ser Arg Glu Asn Glu  
20 25 30  
Ala Asp Leu Ile Cys Ala Ala Ala His Met Thr Ala Glu Gln Met Ala  
35 40 45  
Phe Met Ile Arg Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Cys Ala Pro Met Thr Asn

50	55	60
Ala Ile Ala Asp Lys Leu Asp Leu Pro Leu Met Asn Thr Leu Lys Cys		
65	70	75
Lys Ala Phe Ser Asp Asp Arg His Ser Thr Ala Tyr Thr Ile Thr Cys		80
	85	90
Asp Tyr Ala His Gly Thr Thr Thr Gly Ile Ser Ala Arg Asp Arg Ala		95
	100	105
Leu Thr Cys Asn Gln Leu Ala Asn Pro Glu Ser Lys Ala Thr Asp Phe		110
	115	120
Thr Lys Pro Gly His Ile Val Pro Leu Arg Ala Arg Asp Gly Gly Val		125
	130	135
Leu Glu Arg Asp Gly His Thr Glu Ala Ala Leu Asp Leu Cys Arg Leu		140
145	150	155
Ala Gly Val Pro Glu Val Ala Ala Ile Cys Glu Leu Val Ser Glu Arg		160
	165	170
Asp Val Gly Leu Met Met Thr Leu Asp Glu Cys Ile Glu Phe Ser Lys		175
	180	185
Lys His Gly Leu Ala Leu Ile Thr Val Asp Asp Leu Lys Ala Ala Val		190
	195	200
Ala Ala Lys Gln		205
210		

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 235 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Met Phe Thr Gly Ile Val Glu His Ile Gly Thr Val Ala Glu Tyr Leu		
1	5	10
Glu Asn Asp Ala Ser Glu Ala Gly Gly Asn Gly Val Ser Val Leu Ile		15
	20	25
Lys Asp Ala Ala Pro Ile Leu Ala Asp Cys His Ile Gly Asp Ser Ile		30
	35	40
Ala Cys Asn Gly Ile Cys Leu Thr Val Thr Glu Phe Thr Ala Asp Ser		45
	50	55
Phe Lys Val Gly Ile Ala Pro Glu Thr Val Tyr Arg Thr Glu Val Ser		60
65	70	75
Ser Trp Lys Ala Gly Ser Lys Ile Asn Leu Glu Arg Ala Ile Ser Asp		80
	85	90
Asp Arg Arg Tyr Gly Gly His Tyr Val Gln Gly His Val Asp Ser Val		95
	100	105
Ala Ser Ile Val Ser Arg Glu His Asp Gly Asn Ser Ile Asn Phe Lys		110
	115	120
Phe Lys Leu Arg Asp Gln Glu Tyr Glu Lys Tyr Val Val Glu Lys Gly		125
	130	135
Phe Val Ala Ile Asp Gly Val Ser Leu Thr Val Ser Lys Met Asp Pro		140
145	150	155
Asp Gly Cys Phe Tyr Ile Ser Met Ile Ala His Thr Gln Thr Ala Val		160
	165	170
Ala Leu Pro Leu Lys Pro Asp Gly Ala Leu Val Asn Ile Glu Thr Asp		175
	180	185
		190

12

Val Asn Gly Lys Leu Val Glu Lys Gln Val Ala Gln Tyr Leu Asn Ala  
 195 200 205  
 Gln Leu Glu Gly Glu Ser Ser Pro Leu Gln Arg Val Leu Glu Arg Ile  
 210 215 220  
 Ile Glu Ser Lys Leu Ala Ser Ile Ser Asn Lys  
 225 230 235

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 172 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Ile Lys Gly Leu Gly Glu Val Asp Gln Thr Tyr Asp Ala Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Val Lys Val Gly Ile Val His Ala Arg Trp Asn Lys Thr Val Ile Asp  
 20 25 30  
 Ala Leu Val Gln Gly Ala Ile Glu Lys Leu Leu Ala Met Gly Val Lys  
 35 40 45  
 Glu Lys Asn Ile Thr Val Ser Thr Val Pro Gly Ala Phe Glu Leu Pro  
 50 55 60  
 Phe Gly Thr Gln Arg Phe Ala Glu Leu Thr Lys Ala Ser Gly Lys His  
 65 70 75 80  
 Leu Asp Val Val Ile Pro Ile Gly Val Leu Ile Lys Gly Asp Ser Met  
 85 90 95  
 His Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ser Val Thr His Ala Leu Met Asn Leu  
 100 105 110  
 Gln Lys Lys Ile Arg Leu Pro Val Ile Phe Gly Leu Leu Thr Cys Leu  
 115 120 125  
 Thr Glu Glu Gln Ala Leu Thr Arg Ala Gly Leu Gly Glu Ser Glu Gly  
 130 135 140  
 Lys His Asn His Gly Glu Asp Trp Gly Ala Ala Ala Val Glu Met Ala  
 145 150 155 160  
 Val Lys Phe Gly Pro Arg Ala Glu Gln Met Lys Lys  
 165 170





## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification:</b> <b>C12N 15/52, C12N 1/15,</b> <b>C12N 15/80, C12P 25/00</b>	<b>A3</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 99/61623</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 02 December1999 (02.12.1999)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/EP99/03196 <b>(22) International Filing Date:</b> 10 May 1999 (10.05.1999) <b>(30) Priority Data:</b> 198 23 834.7 28 May 1998 (28.05.1998) DE <b>(60) Parent Application or Grant</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT [/]; (). ALTHÖFER, Henning [/]; (). SEULBERGER, Harald [/]; (). ZELDER, Oskar [/]; (). REVUELTA DOVAL, Jose Luis [/]; (). ALTHÖFER, Henning [/]; (). SEULBERGER, Harald [/]; (). ZELDER, Oskar [/]; (). REVUELTA DOVAL, Jose Luis [/]; (). BASF AKTIENGESELLSCHAFT ; ().	<b>Published</b>	
<b>(54) Title: GENETIC METHOD FOR PRODUCING RIBOFLAVIN</b> <b>(54) Titre: PROCEDE GENETIQUE DE PRODUCTION DE RIBOFLAVINE</b>		
<b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to a genetic method for producing riboflavin. The production of riboflavin in organisms is increased by specially selecting genes of the riboflavin biosynthesis or of the combination thereof in organisms, especially in bacteria, fungi, yeasts and plants, and of the expression thereof. The invention also relates to a nucleic acid fragment containing genes with the sequences SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 or SEQ ID No. 5 or the functional equivalents thereof, to expression vectors containing the nucleic acid fragments, and to organisms containing at least one nucleic acid fragment or at least one vector.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention concerne un procédé génétique de production de riboflavine. Grâce à la sélection spéciale de gènes de la biosynthèse de la riboflavine ou à une combinaison de ces gènes dans des organismes, spécialement dans des bactéries, des champignons, des levures et des plantes, et à leur expression, la production de riboflavine dans ces organismes est accrue. L'invention concerne en outre des fragments d'acide nucléique contenant des gènes correspondant aux séquences SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 ou SEQ ID No. 5 ou leurs équivalents fonctionnels, des vecteurs d'expression contenant de tels fragments d'acide nucléique et des organismes contenant au moins un tel fragment d'acide nucléique ou au moins un tel vecteur.</p>		

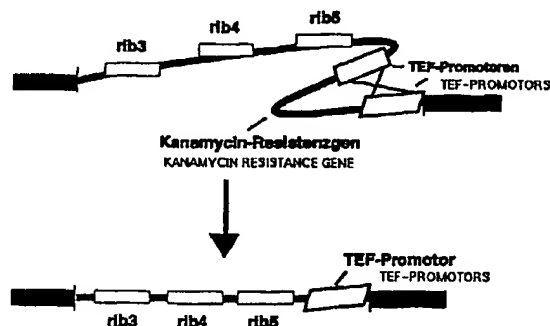
**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 6 : <p style="text-align: center;"><b>C12N 15/52, 15/80, 1/15, C12P 25/00</b></p>	<b>A3</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/61623</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>2. Dezember 1999 (02.12.99)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PC1/EP99/03196</b> (22) Internationales Anmeldedatum: <b>10. Mai 1999 (10.05.99)</b>  (30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><b>198 23 834.7</b></span> <span><b>28. Mai 1998 (28.05.98)</b></span> <span><b>DE</b></span> </div> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).</b>  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>ALTHÖFER, Henning [DE/DE]; Mainstrasse 12, D-67117 Limburgerhof (DE). SEULBERGER, Harald [DE/DE]; Im Speyerer Wingert 25, D-67141 Neuhofen (DE). ZELDER, Oskar [DE/DE]; Rossmarktstrasse 27, D-67346 Speyer (DE). REVUELTA DOVAL, Jose Luis [ES/ES]; Grillo 11, 4 E, E-37001 Salamanca (ES).</b>  (74) Gemeinsamer Vertreter: <b>BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).</b>	(81) Bestimmungsstaaten: <b>AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b>  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>  (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: <b>27. Januar 2000 (27.01.00)</b>	

(54) Title: **GENETIC METHOD FOR PRODUCING RIBOFLAVIN**

(54) Bezeichnung: **GENETISCHES VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON RIBOFLAVIN**



(57) Abstract

The invention relates to a genetic method for producing riboflavin. The production of riboflavin in organisms is increased by specially selecting genes of the riboflavin biosynthesis or of the combination thereof in organisms, especially in bacteria, fungi, yeasts and plants, and of the expression thereof. The invention also relates to a nucleic acid fragment containing genes with the sequences SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 or SEQ ID No. 5 or the functional equivalents thereof, to expression vectors containing the nucleic acid fragments, and to organisms containing at least one nucleic acid fragment or at least one vector.

#### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein genetisches Verfahren zur Herstellung von Riboflavin. Durch die spezielle Auswahl von Genen der Riboflavinbiosynthese bzw. deren Kombination in Organismen, speziell in Bakterien, Pilzen, Hefen und Pflanzen und deren Expression, wird die Riboflavinproduktion in diesen Organismen gesteigert. Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäurefragment enthaltend Gene mit den Sequenzen SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 5 oder deren funktionellen Äquivalente, Expressionsvektoren enthaltend die Nukleinsäurefragmente und Organismen enthaltend mindestens ein Nukleinsäurefragment oder mindestens einen Vektor.

#### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichten.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

International Application No  
PCT/EP 99/03196

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/52 C12N15/80 C12N1/15 C12P25/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 03208 A (BASF AG ;KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE); KAESLER BRUNO (DE); SA) 30 January 1997 (1997-01-30) the whole document ---	1-17
A	EP 0 405 370 A (HOFFMANN LA ROCHE) 2 January 1991 (1991-01-02) cited in the application the whole document ---	1-17
A	DE 44 20 785 A (BASF AG) 5 October 1995 (1995-10-05) cited in the application the whole document ---	1-17
--- -/-		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</span> </div>		
* Special categories of cited documents :		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*B* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">22 November 1999</div>	Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">10/12/1999</div>	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018	Authorized officer  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Kania, T</div>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No

PCT/EP 99/03196

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 821 063 A (HOFFMANN LA ROCHE) 28 January 1998 (1998-01-28) cited in the application the whole document ---	1-17
A	EP 0 569 806 A (BASF AG) 18 November 1993 (1993-11-18) the whole document ---	1-17
A	WO 93 04180 A (BASF AG) 4 March 1993 (1993-03-04) the whole document ---	1-17
A	BROWN D H JR ET AL: "Stable transformation and regulated expression of an inducible reporter construct in Candida albicans using restriction enzyme - mediated integration." MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, (1996 APR 24) 251 (1) 75-80. , XP002123511 cited in the application the whole document -----	17

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/03196

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9703208	A	30-01-1997	DE 19525281 C DE 19545468 A CA 2223877 A CN 1193356 A EP 0839211 A JP 11509409 T	04-04-1996 21-08-1997 30-01-1997 16-09-1998 06-05-1998 24-08-1999
EP 0405370	A	02-01-1991	CN 1049185 A JP 3117489 A JP 10066562 A US 5925538 A US 5837528 A	13-02-1991 20-05-1991 10-03-1998 20-07-1999 17-11-1998
DE 4420785	A	05-10-1995	CA 2186403 A CN 1146781 A WO 9526406 A EP 0751995 A JP 9510618 T US 5821090 A	05-10-1995 02-04-1997 05-10-1995 08-01-1997 28-10-1997 13-10-1998
EP 0821063	A	28-01-1998	BR 9704067 A CN 1177004 A JP 10084978 A	05-01-1999 25-03-1998 07-04-1998
EP 0569806	A	18-11-1993	JP 6022765 A	01-02-1994
WO 9304180	A	04-03-1993	EP 0599945 A JP 6509942 T	08-06-1994 10-11-1994

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03196

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 6 C12N15/52 C12N15/80 C12N1/15 C12P25/00		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12N C12P		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 03208 A (BASF AG ;KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE); KAESLER BRUNO (DE); SA) 30. Januar 1997 (1997-01-30) das ganze Dokument	1-17
A	EP 0 405 370 A (HOFFMANN LA ROCHE) 2. Januar 1991 (1991-01-02) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-17
A	DE 44 20 785 A (BASF AG) 5. Oktober 1995 (1995-10-05) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-17
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertechnischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertechnischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts
22. November 1999		10/12/1999
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bevollmächtigter  Kania, T

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) Juli 1992

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/03196

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	EP 0 821 063 A (HOFFMANN LA ROCHE) 28. Januar 1998 (1998-01-28) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	1-17
A	EP 0 569 806 A (BASF AG) 18. November 1993 (1993-11-18) das ganze Dokument ----	1-17
A	WO 93 04180 A (BASF AG) 4. März 1993 (1993-03-04) das ganze Dokument ----	1-17
A	BROWN D H JR ET AL: "Stable transformation and regulated expression of an inducible reporter construct in Candida albicans using restriction enzyme - mediated integration." MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, (1996 APR 24) 251 (1) 75-80. , XP002123511 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	17



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03196

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9703208 A	30-01-1997	DE 19525281 C	04-04-1996
		DE 19545468 A	21-08-1997
		CA 2223877 A	30-01-1997
		CN 1193356 A	16-09-1998
		EP 0839211 A	06-05-1998
		JP 11509409 T	24-08-1999
EP 0405370 A	02-01-1991	CN 1049185 A	13-02-1991
		JP 3117489 A	20-05-1991
		JP 10066562 A	10-03-1998
		US 5925538 A	20-07-1999
		US 5837528 A	17-11-1998
DE 4420785 A	05-10-1995	CA 2186403 A	05-10-1995
		CN 1146781 A	02-04-1997
		WO 9526406 A	05-10-1995
		EP 0751995 A	08-01-1997
		JP 9510618 T	28-10-1997
		US 5821090 A	13-10-1998
EP 0821063 A	28-01-1998	BR 9704067 A	05-01-1999
		CN 1177004 A	25-03-1998
		JP 10084978 A	07-04-1998
EP 0569806 A	18-11-1993	JP 6022765 A	01-02-1994
WO 9304180 A	04-03-1993	EP 0599945 A	08-06-1994
		JP 6509942 T	10-11-1994